

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO

ILENE CRISTINE ROSIA CESAR

APLICAÇÕES DE TÉCNICAS ÓPTICAS E DE MICROANÁLISE EM
PROCEDIMENTOS ESTÉTICOS NA DENTÍSTICA

São José dos Campos, SP
2008

ILENE CRISTINE ROSIA CESAR

**APLICAÇÕES DE TÉCNICAS ÓPTICAS E DE MICROANÁLISE EM
PROCEDIMENTOS ESTÉTICOS NA DENTÍSTICA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Egberto Munin

Orientadora: Profa. Dra. Stella Regina Zamuner

São José dos Campos, SP
2008

C414a

Cesar, Ilene Cristine Rosia

Aplicações de Técnicas Ópticas e de Microanálise em Procedimentos Estéticos na Dentística / Ilene Cristine Rosia César; Orientador: Prof Dr. Egberto Munin, Orientadora Profa.Dra.Stella Regina Zamuner. São José dos Campos, 2008.

1 Laser disc.: color

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2008.

1. Clareamento de dente 2. Resinas Compostas 3. Análise Espectral Raman
4. Fotorreflectância I. Munin, Egberto, Orient. II. Zamuner, Stella Regina, Orient. III.
Título.

CDU:616.314-003

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiadores ou transmissão eletrônica.

Assinatura da aluna: *Ilene Cristine Rosia*

Data: 18 de Dezembro de 2008.

ILENE CRISTINE ROSIA CESAR

**“APLICAÇÕES DE TÉCNICAS ÓPTICAS E DE MICROANÁLISE EM PROCEDIMENTOS
ESTÉTICOS NA DENTÍSTICA”**

Tese aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Engenharia Biomédica, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. **LANDULFO SILVEIRA JUNIOR** (UNIVAP) _____

Prof^ª. Dra. **STELLA REGINA ZAMUNER** (UNIVAP) _____

Prof. Dr. **EGBERTO MUNIN** (UNIVAP) _____

Prof. Dr. **LUIS ALEXANDRE M. S. PAULILLO** (UNICAMP) _____

Prof. Dr. **JOSÉ ROBERTO LOVADINO** (UNICAMP) _____

Prof^ª. Dra. Sandra Maria Fonseca da Costa

Diretora do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 18 de dezembro de 2008.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Waldemar Cesar e Neusa Rosia Cesar, dedico este trabalho e agradeço pelo amor, compreensão, pelo exemplo de força e dedicação.

À minha irmã, Marlisa Andréia Rosia Cesar, uma flor com uma pétala a mais, que com sua diferença, mostrou o valor da superação, dando estímulo e força, para transpor os obstáculos da vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, capacidade e inspiração por ter tornado possível a realização de mais um objetivo.

Aos meus avós, Roberto Domingos João Rosia (in memorian) e Luzia Corbani Rosia, que contribuíram de uma forma muito especial, para realização de mais uma etapa da minha vida, e as minhas tias Neide Rosia Bosquetti e Nilda Rosia Ivanov e aos meus tios, Roberto Antônio Rosia (in memorian), Heitor Bosquetti e Sérgio Ivanov, que nos momentos difíceis estavam sempre me incentivando a alcançar mais um objetivo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Egberto Munin, por todos esses anos de incentivo, apoio e amizade, e pela orientação e dedicação. Sua presença e competência, sempre contribuíram muito para o meu crescimento profissional e pessoal. Meus sinceros agradecimentos.

A minha orientadora Profa. Dra. Priscila C. S. Liporoni, pela confiança e principalmente pela amizade a mim depositada. Agradeço por me permitir usufruir seu exemplo de profissionalismo, me ajudando em todos os momentos necessários.

Ao meu querido amigo Luís Eduardo Silva Soares, pela amizade, estímulo e exemplo de dedicação à pesquisa científica, contribuindo construtivamente com conhecimento e disponibilidade para realização desse trabalho.

Ao meu amigo e colega de laboratório, Leandro Procópio Alves, pelos ensinamentos, dedicação à pesquisa e contribuição nesse trabalho.

Aos meus queridos amigos, Cibelle Barbosa Lopes e Rick Rocha, que contribuíram para o crescimento e alegrias vivenciados nesse período, que de forma direta e indireta contribuíram para realização desse trabalho.

As minhas amigas de força, Raffaella Di Iório Geronymo, Cláudia Carreira e Sílvia Frade, pela amizade, apoio e carinho, fundamental nos momentos difíceis.

A todos os co-autores dos artigos componentes deste trabalho de tese.

À Prof^a. Stella Regina Zamuner, pela contribuição e orientação.

Ao Magnífico Reitor dessa Universidade Prof. Dr. Batista Gargione, pela oportunidade, apoio e estímulo em desenvolver este trabalho, juntamente com o meu exercício profissional, bem como, a concessão de bolsa de estudo para o programa de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. José Benedicto de Mello, pela amizade, estímulo e participação em minha formação científica e acadêmica.

À Faculdade de Odontologia – UNIVAP, por ter sediado todos esses anos de estudo, tanto na graduação, quanto na pós-graduação.

Aos funcionários do IP&D e da Biblioteca, por todo o auxílio e atenção durante o desenvolvimento desta tese.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”

Cora Coralina

APLICAÇÕES DE TÉCNICAS ÓPTICAS E DE MICROANÁLISE EM PROCEDIMENTOS ESTÉTICOS NA DENTÍSTICA

RESUMO

O objetivo do estudo 1, foi avaliar o efeito de 2 agentes clareadores, associados à aplicação de laser de Argônio. Foram utilizados 20 dentes humanos, foram seccionados obtendo-se, 75 fragmentos dentais, com dimensões de 4X4 mm. Os espécimes foram divididos em 5 grupos experimentais: O grupo 1 foi o grupo controle, o qual não recebeu nenhum tratamento clareador. Nos grupos 2 e 4 foram utilizados peróxido de carbamida 35 % (Opalescence Quick), respectivamente com laser e com fotopolimerizador. Nos grupos 3 e 5 foram utilizados peróxido de carbamida a 37 % (Whiteness Super – FGM), e com laser e com fotopolimerizador, respectivamente. Os tratamentos foram realizados em 3 sessões com um intervalo de 7 dias. O efeito dos agentes clareadores sobre o esmalte dental hígido foi analisado por fotorrefletância e testes de microdureza Vickers, comparando-se o clareamento convencional com o clareamento com laser de Argônio e os dois produtos submetidos à técnica. Na fotorrefletância observamos que todas as amostras irradiadas com laser tiveram o mesmo resultado, independente da marca, já as amostras irradiadas com o aparelho fotopolimerizador, tiveram uma diferença, sendo que o peróxido de carbamida 37 % não teve um clareamento com a mesma efetividade que o peróxido de carbamida 35 %. Na microdureza Vickers do esmalte hígido, não apresentou diferença significativa entre os dois agentes clareadores independente da ativação por laser ou lâmpada. No estudo 2, a Fotorrefletância e o FT-Raman, foram usados nesse estudo, para avaliar alteração de cor e perda mineral, após à técnica de clareamento dental fotoativados com LED/Laser. Quarenta fragmentos bovinos de 4X4 mm foram divididos em 4 grupos: G1-Whiteness HP Maxx, G2-Whiteness HP, G3-Whiteform- Perox Red Form, G4-Opalescence Xtra. O Grupo 3 apresentou maior efetividade no clareamento, mas não houve perda mineral significativa em todos os grupos. No estudo 3, avaliou-se através da espectroscopia FT-Raman e Fotorrefletância, a eficácia do uso de agentes protetores superficiais das resinas compostas frente ao manchamento por café e à variação da fonte de luz ativadora. Sessenta corpos-de-prova de resina composta foram fotoativados por um aparelho LED (LD13[®] - GGDent) e um aparelho de luz halógena (Soft-Start[®] – Degulux). Vinte corpos-de-prova do grupo controle (C) foram fotoativadas pela luz halógena (H) e pelo LED (L) e não foram protegidos pelo selante de superfície (Grupos luz Hálogena Controle - HC e LED Controle - LC) e os outros 40 corpos-de-prova foram divididos em 4 grupos (Grupos Fortify[®] - HF, PermaSeal[®] - HP, LF, LP). Os corpos-de-prova dos grupos HF e LF receberam a aplicação do selante de superfície Fortify[®] (BISCO) e dos grupos HP e LP foram protegidos com o selante PermaSeal[®] (Ultradent). Todas as amostras foram submetidas ao manchamento por café, por um período de 14 dias, e avaliadas antes e após o manchamento. O manchamento da resina composta foi maior para as amostras que receberam a aplicação dos selantes. Os grupos ativados pelo LED apresentaram um maior manchamento. A análise por espectroscopia FT-Raman mostrou-se ser efetiva na análise da degradação da matriz da resina. A análise por fotorrefletância mostrou-se ser efetiva na avaliação da coloração da resina composta frente ao manchamento por café.

Palavras-chave: Clareamento dental, Espectroscopia Raman, Fotorrefletância, Resinas compostas LED, Laser

APPLICATIONS FOR TECHNICAL AND OPTICAL MICROANALYSIS PROCEDURES IN THE AESTHETIC DENTISTRY

ABSTRACT

Twenty human embedded third molars were used in this *in vitro* study to evaluate the effects of two bleaching products associated or not with Argon laser irradiation. The samples were cut into 4 parts resulting in 75 specimens. The specimens were divided at random into 5 groups. Two bleaching products were used in this experiment: 35 % carbamide peroxide solution (Opalescence Quick) and 37 % carbamide peroxide solution (Whiteness Super – FGM). Group 1 was separated as a control group. Group 2 was exposed to 37 % carbamide peroxide bleaching solution and developed with an Argon laser application. The same solution was used in Group 3 but the bleaching was developed with an halogen lamp irradiation. The 35 % carbamide peroxide was used in Groups 4 and 5. One was developed as in Group 2 and the other as in Group 3. The samples were analyzed under Vickers microhardness tests, investigating indentation impressions on the samples. In addition, the samples were submitted to a photoreflectance experiment. It was observed that Group 2 presented more white spectra than Group 3. Groups 4 and 5 showed the same results independent of the use of the laser or the halogen lamp. Comparing both bleaching products, the 35 % carbamide peroxide (Opalescence Quick) was more efficient on its purposes than the other one. In the study 2, Reflectance and FT-Raman spectroscopy have been used in this *in vitro* study to evaluate the effects of 35% hydrogen peroxide bleaching on bovine teeth. Forty bovine enamel fragments four experimental groups according to the hydrogen peroxide gel manufacturer's application: G1-Whiteness HP Maxx, G2-Whiteness HP, G3-Whiteform- Perox Red Form, G4-Opalescence Xtra. The analyses before treatments were used as control. All groups were activated with an LED/laser system. The reflectance and Raman analyses of the enamel samples were performed before and after bleaching. Enamel reflectance was significantly greater after the bleaching in group G3 than in groups G1, G2 and G4 ($p < 0.01$). FT-Raman spectroscopy data showed no significant chemical changes in the inorganic components for tested groups ($p > 0.05$). Under the conditions of this study, 35% hydrogen peroxide Whiteform – Perox Red Form gel, exhibited great bleaching potential. The study 3 evaluated by FT-Raman Spectroscopy and photoreflectance, the effectiveness of the use of the superficial protecting agents front to the staining by coloring substances and to the variation of the LCUs. Sixty specimens of resin composite were photoactivated by one LED unit (LD13[®] - GGDent) and by one halogen light unit (Soft-Start[®] - Degulux). Twenty specimens of the control group were not protected by the surface sealant (Groups HC and LC) and the other 40 specimens were divided in 4 groups (Groups HF, HP, LF and LP). Groups HF and LF specimens received the application of the Fortify[®] (BISCO) surface sealant and the specimens of the groups HP and LP were protected by the PermaSeal[®] (Ultradent) surface sealant. FT-Raman spectroscopy spectra showed to be effective in the analysis of the composite resin degradation. The photoreflectance analysis showed to be effective in the analysis of the composite resin color change after the coffee staining.

Keywords: Dental Bleaching, Raman spectroscopy, Photoreflectance, composite resin, LED, Laser

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 AGENTES CLAREADORES.....	11
1.2 FONTES DE ATIVAÇÃO.....	13
1.3 FOTORREFLECTÂNCIA.....	14
1.4 MICRODUREZA DO ESMALTE.....	18
1.5 ESPECTROSCOPIA FT-RAMAN.....	19
1.6 RESINAS COMPOSTAS E SELANTES DE SUPERFÍCIE	21
2 OBJETIVOS.....	24
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 RESULTADOS	25
3.1 ARTIGO 1 - AMERICAN JOURNAL OF DENTISTRY, v.18: P: 219-222., 2005	25
3.2 ARTIGO 2 - PHOTOMEDICINE AND LASER SURGERY, v.XX, P.XX, 2008	41
3.3 ARTIGO 3 - AMERICAN JOURNAL OF DENTISTRY, VOL. 20, No. 5, OCTOBER, 2007	63
4 DISCUSSÃO.....	90
5 CONCLUSÕES	98
REFERÊNCIAS.....	100
ANEXO A - DECLARAÇÃO DE DOAÇÃO DE DENTES BOVINOS.....	108
ANEXO B - AMOSTRAS IMERSAS EM SALIVA.....	109
ANEXO C - CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO EM PESQUISA CIENTÍFICA	110
ANEXO D – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	111
ANEXO E - PRINCIPAIS EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....	113

1 INTRODUÇÃO

1.1 Agentes Clareadores

Hoje, há um grande interesse dos pacientes em relação à estética. Um sorriso harmonioso proporciona um equilíbrio da face. A alteração de cor dos dentes é um aspecto que pode levar as pessoas ao constrangimento, tornando-as apáticas ao convívio social. Atualmente procedimentos estéticos podem ser feitos dentro de uma odontologia moderna menos invasiva, como a técnica de clareamento dental (BARATIERI *et al.*, 1996; BLANKENAU; GOLDSTEIN; HAYWOOD, 1999; CONCEIÇÃO *et al.*, 2000).

As alterações de cor podem ocorrer devido a uma série de fatores, podendo estar associadas a processos etimológicos. As manchas extrínsecas podem ser adquiridas através da dieta alimentar e produtos de uso oral com grande potencial corante, como café, chá preto, tabaco, bebidas à base de cola, etc. As manchas intrínsecas podem ser classificadas como adquiridas ou congênitas. As congênitas estão relacionadas a alterações estruturais durante o estágio de formação dental. Já as adquiridas podem ser pré-eruptivas e pós-eruptivas, ou seja, este escurecimento pode ser natural, fisiológico ou provocado por doenças, distúrbios sistêmicos, trauma ou ingestão excessiva de algum medicamento. No caso dos dentes não vitais, o escurecimento pode decorrer de necrose pulpar e detritos de materiais restauradores. Dentre esses fatores de alterações de cor, as manchas intrínsecas são as mais difíceis de serem clareadas, devido a sua etiologia e diagnóstico (BARATIERI *et al.*, 1996; CONCEIÇÃO *et al.*, 2000)

O clareamento dental se baseia na aplicação de agentes químicos que, através de uma reação química de oxidação, removem os pigmentos orgânicos dos dentes (BARATIERI *et al.*, 1996; MORATO *et al.*, 1998; TAMES *et al.*, 1998).

O primeiro clareamento de dente não vital surgiu em 1848 e em dentes vitalizados, em 1868. Abbot em 1918 preconizou o uso de espátula aquecida para acelerar a reação química de oxidação. Esse conceito, embora modificado, ainda é usado por alguns profissionais até hoje na técnica de clareamento em consultório. No entanto, têm-se utilizado atualmente, outras formas de acelerar a reação química, tais como o uso de lâmpadas específicas e de agentes clareadores fotossensíveis (HAYWOOD, 1992; BARATIERI *et al.*, 1996, CONCEIÇÃO *et al.*, 2000).

De acordo com Goldstein (1997) e Asfora *et al.* (1998), o clareamento de dentes vitais já era empregado desde 1877, quando se utilizava ácido oxálico. Em 1884, o uso do peróxido de hidrogênio foi descrito pela primeira vez.

Os agentes clareadores são veículos de radicais livres de oxigênio, que em contato com os tecidos dentais promovem oxidação dos pigmentos incorporados a eles. A matéria orgânica é então convertida em dióxido de carbono e água, removendo-se assim os pigmentos da estrutura dentária por difusão (BARATIERI *et al.*, 1996).

Os agentes clareadores são constituídos de peróxidos e usados em altas concentrações, para uso profissional, ou baixas concentrações, pelos pacientes sob supervisão do profissional. Podem ser empregados na forma de solução ou gel, em concentrações que variam de acordo com a técnica utilizada. O peróxido de hidrogênio é indicado para clareamento de dentes vitais e não vitais. Quando em contato com os tecidos dentais, o peróxido de hidrogênio se degrada em oxigênio e água, sendo o oxigênio responsável pelo clareamento dental (BARATIERI *et al.*, 1996; LI, 1996).

Trabalhos comparativos entre clareamento dental caseiro com o tratamento em consultório, envolvendo a aplicação de peróxido de hidrogênio, mostraram que o clareamento dental caseiro parece ser mais seguro e menos invasiva, por preservar a estrutura dental sadia (HAYWOOD; HEYMANN, 1989; HAYWOOD; 1992; BARATIERI *et al.*, 1996). Dentre suas vantagens, destacam-se a facilidade da técnica, o baixo custo e a efetividade na maioria dos casos. Além disso, o clareamento caseiro pode ser também recomendado para pessoas insatisfeitas com a cor do seu dente, escurecimento fisiológico, pigmentação extrínseca, ou em casos de fluorose, dentes manchados por tetraciclina ou dentes escurecido por trauma (HAYWOOD, 1992).

O peróxido de carbamida foi inicialmente usado como antiinflamatório, em endodontia, na limpeza de canais radiculares, e em ortodontia, como agente antiplaca. Hoje em dia, é uma alternativa de tratamento em dentes quando há alteração de cor. O clareamento com o peróxido de carbamida está amplamente difundido, tendo atualmente uma estimativa de sete milhões de casos com índice de sucesso acima de 90 % (MORATO; DUARTE; ALBUQUERQUE, 1998).

Os agentes clareadores têm sido motivos de muito estudo atualmente, pois existe uma infinidade de marcas e peróxidos. A técnica de clareamento pode ser acelerada através de um aumento de 10 °C na temperatura do meio, o que duplica a velocidade da reação do agente clareador com subprodutos oxidantes e auxilia sua difusão na estrutura dental (BARATIERI *et al.* 1996). Devido a esse aquecimento, há uma preocupação muito grande em relação a

possíveis injúrias causado à polpa devido o aumento de temperatura, e também em relação aos agentes clareadores. Estudos têm sido realizados para verificar a resposta da polpa aos peróxidos 30 - 35 %. A polpa reage ao clareamento através de resposta inflamatória suave à moderada, manifestando-se clinicamente como sensibilidade de modo transitório e reversível. Um caso apenas foi descrito, onde o paciente relatou uma dor aguda após o clareamento vital. A resposta clínica pulpar provocada pela solução de peróxido de carbamida 10–15 % foi comparável à provocada pela solução 30–35 %, embora não tão severa. A duração ou a frequência do tratamento pode ser modificada conforme a sensibilidade do paciente aos produtos clareadores, embora a aplicação de flúor ou outras substâncias dessensibilizantes possam ajudar a diminuir esses sintomas (PESUM; MADDEM, 1999; BAUMGARTNER *et al.*, 1983).

Heymann (1987) e Crews *et al.* (1992) relataram que na odontologia restauradora, principalmente em procedimentos estéticos, necessitam-se conhecimentos científicos e artísticos. Elementos artísticos como forma, simetria, proporcionalidade, posição, alinhamento, textura superficial e cor, deveriam ser considerados. A odontologia estética conservativa proporcionou uma nova dimensão ao tratamento, aliando resultados satisfatórios à prevenção de estrutura dental.

1.2 Fontes de Ativação

As técnicas de clareamento para dentes vitais evoluíram muito, em relação ao tempo de aplicação do tratamento e principalmente em relação à fonte ativadora. Com avanço tecnológico surgiram técnicas de clareamento dental para facilitar sua utilização e melhorar o conforto, a segurança e diminuição de tempo na execução da técnica (REYTO, 1998). Entre eles está o clareamento com laser de Argônio, laser de Diodo, com LED, com lâmpada de Xenônio, com lâmpadas de arco de plasma e com lâmpada do fotopolimerizador.(ZANIN; BRUGNERA, 2002).

As emissões fototônicas como os lasers e o LED para clareamento dental são radiações não ionizantes e concentradas que ao serem absorvidas pelos tecidos com o qual interagem resultam em efeitos fotoquímicos e mínimos efeitos fototérmicos tendo com alvo moléculas escurecidas. Esses mecanismos geram um aumento mínimo de temperatura sem

dano ao tecido pulpar, pois, aquecem o produto e não a estrutura dental. (ZANIN; BRUGNERA JR, 2004).

A diferença básica entre os lasers e o LED é que no LED predomina o mecanismo de emissão espontânea de radiação e nos lasers predomina a emissão estimulada de luz (ZANIN; BRUGNERA Jr., 2002).

O laser emite luz monocromática e tem um desempenho superior ao LED, mas seu uso é mais caro e complicado. A luz laser é caracterizada por apresentar ondas eletromagnéticas com o mesmo comprimento de onda, direção, frequência e cor pura (MIYASHITA *et al*, 2004).

Entre os dispositivos utilizados como fonte de luz para o clareamento dental, os LED azuis são os mais simples. Sua diferença em relação aos lasers reside no espectro mais largo da luz gerada sem perder a monocromaticidade. O LED são em geral utilizados em sistemas de transmissão de menor capacidade. Embora seja uma fonte de luz não coerente, se comparados com a luz halógena apresentam um espectro de emissão bem mais estreito (monocromaticidade) tendo um aproveitamento muito melhor que a luz halógena (MIYASHITA *et al*, 2004).

O LED não altera a emissão de luz com o tempo, sua vida útil é de 100 mil horas pois não apresentam filtros que podem se degradar (MIYASHITA *et al*, 2004). Nos sistemas de LED azuis conjugados ao laser infravermelho, estes têm a função de ativar o clareamento enquanto o laser está relacionado ao efeito terapêutico na prevenção da sensibilidade dental. Em alguns outros sistemas, também é auxiliar do efeito fototérmico do gel (MIYASHITA *et al*, 2004).

O LED surge como uma alternativa viável para o clareamento dental, pois além do conforto do paciente é uma tecnologia de custo bem mais acessível que os lasers, estando numa faixa de emissão muito próxima a eles, o que determina um grande aproveitamento devido à sua pureza espectral. O LED é uma opção muito eficiente para o processo de clareamento (ZANIN; BRUGNERA Jr.; 2004).

1.3 Fotorrefletância

Para a Óptica, a cor de um objeto está diretamente relacionada ao comprimento de onda e quantidade de luz incidente que é refletida. Um dente escuro absorve maior quantidade de luz, provocada pela presença de cadeias moleculares longas e complexas no interior da

estrutura dental. Sendo assim, um dente normal tem uma menor absorção e uma maior reflexão da luz, mostrando uma superfície mais clara (BARATIERI *et al.*, 1996).

A tonalidade do dente é determinada principalmente pelas propriedades da dentina, cabendo ao esmalte desempenhar apenas um pequeno papel, através da difusão do comprimento das ondas (BOSCH; COOPS, 1995).

Os dentes não apresentam coloração uniforme; a porção central parece representar melhor a tonalidade do dente e os caninos geralmente são mais escuros quando comparados aos incisivos (GOODKING; CHWABACHER, 1987). A mensuração da cor do dente por avaliação visual é uma tarefa complexa. Várias escalas são utilizadas como parâmetro (Vita, Chromascop e Bioforme, entre outras), entretanto as mesmas dependem da interpretação do avaliador.

Muitos trabalhos apontaram para o uso de colorímetro convencional, desenhado para medir as cores de objetos oblíquos. Melnik *et al.* (1998) apresentaram os resultados de estudos espectroscópicos de materiais dentais e dentes humanos que mostraram uma característica de comportamento do espectro óptico coletado com uma fibra óptica. Os autores observaram que o espectro registrado dependeu da posição da fibra. O aparelho é bom para classificar todas as tonalidades de cor dos dentes das escalas Vita, Chromascop e Bioforme, aponta a melhor cor que combina com os materiais restauradores para dentes naturais. Seguindo a mesma linha de pesquisa, Rosientiel *et al.* (1991), verificaram a mudança de cor dos dentes após o clareamento dental no consultório, monitorado por um colorímetro. Vinte pacientes jovens adultos participaram de um estudo duplo-cego, sendo que a metade dos participantes teve a arcada superior clareada e a outra metade foi controle. Esse trabalho resultou em uma diferença estatística significativa depois de 6 meses, embora necessitem de mais estudos sobre o assunto.

O uso de um espectrômetro de reflectância tem sido utilizado como alternativa na determinação da cor verdadeira dos dentes, considerando-se diversas condições como rugosidade e ausência de uma geometria regular de superfície. O espectrômetro minimiza as perdas de luz nas bordas das amostras e maximiza a coleta de luz refletida em todas as direções; a mudança na reflexão dos dentes está relacionada à mudança de cor dos mesmos (KWON *et al.*, 2002).

A reflectância ocorre na superfície do tecido e inclui tanto a componente difusa quanto a especular, e as quantidades relativas são dependentes da rugosidade da superfície. A reflexão especular é gerada por superfícies lisas, enquanto que a reflexão difusa ocorre em interfaces opticamente rugosas. A luz retroespalhada não pode ser confundida com a refletida

difusamente, que é um fenômeno interfacial; a luz retroespalhada surge de fótons que atravessaram a superfície do tecido e ao percorrerem um caminho aleatório dentro do mesmo retornam ao meio de origem. Embora o tecido dental duro seja altamente espalhador na região do espectro visível e do infravermelho próximo, o espalhamento é desprezível em relação à absorção entre $\lambda = 9$ e $11 \mu\text{m}$, e toda luz refletida é devida à reflexão Fresnel da interface ar/tecido (FRIED *et. al.*, 1997). A utilização de uma esfera integradora acoplada a um espectrômetro para a captação da luz refletida é importante, pois ela permite a coleta da luz difundida pela amostra em qualquer direção (KWON *et. al.*, 2002).

O grau de absorção é determinado pelo comprimento do caminho da luz incidente no dente e pelo coeficiente de absorção do dente. No dente clareado, a absorção também depende do grau da concentração do cromóforo. Na medição da cor do dente, a escolha do instrumento apropriado é importante devido ao comprimento do caminho que a luz percorre no interior do dente. A luz incidente viaja poucos milímetros lateralmente no dente, antes dela imergir na superfície, se o dente for espesso. Assim, se a janela de coleta da luz não for larga o suficiente para cobrir a luz refletida, alguma fração da luz incidente no dente pode ser excluída da medição. Para medição da cor real do dente, o qual possui rugosidade de superfície e/ou uma geometria de superfície não-uniforme, sendo que um espectrômetro ajustado para o modo de reflectância difusa deve ser utilizado (KWON *et. al.* 2002).

Estudos têm sido realizados utilizando-se a análise por fotorreflectância, para observar o esmalte dental após o tratamento clareador. Cesar *et. al.* (2005) pôde observar através da fotorreflectância que não houve diferenças entre as amostras clareadas com peróxido de carbamida a 35% e a 37%, irradiadas com laser de Argônio. Já as amostras que foram irradiadas com lâmpada halógena, o peróxido de carbamida a 35% mostrou ser mais efetivo do que o de concentração de 37%.

Kwon *et. al.* (2002) encontraram, após o clareamento com peróxido de hidrogênio a 30%, um aumento na reflectância desde o primeiro dia, sendo que o clareamento foi realizado todo dia, por 3 dias consecutivos. Um valor menor na reflectância do esmalte bovino clareado foi encontrado entre 400 e 500 nm; no esmalte bovino não-clareado encontrou-se um menor valor na reflectância na região espectral entre 400 e 600 nm. Com a progressão do clareamento, a cor do dente muda de amarelo para branco. Desta forma, a reflectância aumentou gradualmente por causa da diminuição da absorção da luz nos comprimentos de onda entre 400 e 500 nm.

Várias técnicas novas têm sido sugeridas para quantificar a remoção de pigmentos de espécimes de esmalte dental, dentre elas temos a quantificação de luz induzida por

fluorescência (QLF) e o sistema de coordenadas de cores (CIE L*a*b*). A verificação da cor do dente por avaliação visual é uma tarefa complexa. Várias tentativas para se construir um instrumento seguro, com o qual se possa medir a coloração dos dentes, têm sido testadas nos últimos 15 anos. Tem sido proposto um sistema colorimétrico simplificado, baseado nas coordenadas de cores. O sistema colorimétrico L*a*b* denota a luminosidade do objeto (preto = 0 e branco = 100), a* confere a posição em um eixo vermelho-verde, e b* confere a posição no eixo amarelo-azul, onde a* = b* = 0 corresponde a um material cinzento (MELNIK; RAWICZ, DETZ, 1998). Jones *et.al.* (1999) registraram em seu estudo, *in vitro*, alterações de cor promovidas por três técnicas de clareamento através, também, do sistema de coordenadas de cores (CIE L*a*b*). Foram utilizadas três técnicas de clareamento: utilizando peróxido de carbamida a 10% e a 20% por duas semanas; e utilizando peróxido de hidrogênio a 35% ativado por laser de Argônio em uma única sessão, registrando-se a cor inicial dos dentes, após uma semana e após duas semanas. Os dentes que foram expostos ao peróxido de carbamida a 10% e a 20% por duas semanas apresentaram alteração de cor, sendo que o peróxido de carbamida a 20% apresentou uma alteração de cor mais perceptível. Os dentes tratados com peróxido de hidrogênio a 35% ativados pelo laser de Argônio em uma única sessão não apresentaram nenhuma alteração de cor perceptível. Nenhuma alteração significativa foi encontrada na alteração de cor final entre o grupo laser e o grupo controle.

Alguns estudos utilizam máquinas digitais para registrar a cor dos dentes e analisam o RGB das imagens e os transformam em valores numéricos derivados para a cor dos dentes em L*a*b*.

Para Yiming (2003) o clareamento dental tem se tornado um procedimento popular e rotineiro e sua eficácia e segurança tem sido bem documentada. Mas, a medição da cor do elemento dental, particularmente, na avaliação da eficácia de um sistema que pretenda acentuar o clareamento dental continua ser um desafio. Um dos instrumentos utilizados para avaliar o clareamento em estudos clínicos é o Minolta Chroma Meter CR-321. Esse artigo descreve esse instrumento e discute vários procedimentos para medição, bem como suas vantagens, limitações, e desvantagens. As informações disponíveis indicaram que o Minolta Chroma Meter CR-321 fornece a medição quantitativa e objetiva da cor do elemento dental. Os dados deste aparelho são inconstantes quando utilizados com instrumentos manuais, como o Vitapan Classical shade Guide. Também é questionável se a pequena área adequadamente medida representa a cor do elemento dental inteiro. O desafio mais crítico é a carência de métodos para a interpretação da mudança de cor do dente em estudos que avaliam a eficácia do sistema de clareamento. Conseqüentemente, atualmente apenas os dados obtidos a partir

do Chroma Meter parecem não serem adequados para a determinação da mudança de cor do elemento dental em pesquisas de clareamento, mas a medição quantitativa pode ser utilizada como dados suplementares ou de suporte. Ainda são necessárias pesquisas para o desenvolvimento e aprimoramento do instrumento e da técnica para a medição quantitativa da cor do elemento dental e interpretação dos dados obtidos para avaliação da mudança de cor.

1.4 Microdureza do Esmalte

Existem muitos testes para medir a dureza de superfície. A grande maioria está baseada na capacidade do material de resistir à penetração de uma ponta com uma carga específica. Os testes mais freqüentemente usados para determinação da dureza dos materiais dentários são os de Brinell, de Rockwell, de Vickers e de Knoop. A seleção entre estes testes é freqüentemente determinada pelo tipo do material a ser analisado (PHILLIPS, 1993).

Devido à relação que existe entre dureza e outras propriedades físicas os testes de dureza encontraram aplicação universal. A interpretação usual dada ao termo dureza é a de resistência à “indentação”. Testes de dureza por indentação possuem a vantagem de serem simples, baratos, reproduzíveis e, não promover danos as amostras.

Os testes clássicos de dureza por indentação são classificados usualmente em duas categorias: testes de macroindentação, para cargas maiores que 1 kg, e testes de microindentação para cargas menores realizadas em materiais friáveis. Em odontologia as medidas mais comuns são os testes de microindentação Knoop ou Vickers. Estas são técnicas em que a indentação é realizada e sua área medida, para calcular a dureza. A dureza Vickers é definida como a resistência à deformação plástica permanente, causada por indentação e pode ser calculada como a carga aplicada dividida pela área de superfície projetada da indentação criada em consequência do teste (BARATIERI *et al.*, 2001).

Newbrum e Pigman (1960), em uma revisão, descreveram e compararam diversos métodos para determinação de dureza superficial em esmalte e dentina. Nesse trabalho, os autores afirmaram que o uso de penetrador tipo Knoop apresentava vantagens, pois as impressões tinham dimensões definidas, e que as medidas de microdureza pareceriam ser um método sensível e confiável para avaliar a progressão de cáries naturais e artificiais.

Shannon, Spencer e Gross (1993) utilizaram molares com a finalidade de avaliar os efeitos de três agentes clareadores contendo peróxido de carbamida com diferentes valores de pH, na microdureza do esmalte. Enquanto não estavam sendo submetidos ao tratamento clareador, que durava de duas a quatro semanas, os corpos-de-prova ficavam imersos em saliva

humana. Não houve diferença estatística entre o grupo controle e os tratados por duas ou quatro semanas. Em um outro estudo, também verificaram o efeito de duas soluções clareadoras a base de peróxido de carbamida 10 % na dureza do esmalte superficial. Trinta fragmentos coronários de dentes foram clareados por 241 horas, sendo controle e teste do mesmo dente. Alterações de cores ocorreram visivelmente e os fragmentos foram testados em microdurômetro com penetrador Knoop. Uma das soluções demonstrou não haver diferença estatística significativa na dureza do esmalte em nenhuma profundidade. A outra solução demonstrou não haver diferença significativa abaixo de 50 μm . Os autores concluíram que este efeito pode não ter reflexo clínico, devido aos efeitos remineralizantes da saliva (MCCRACKEN; HAYWOOD, 1995).

Pinheiro Jr *et al* (1996) verificou uma diminuição da microdureza do esmalte depois da aplicação dos agentes clareadores de peróxido de carbamida por 8 horas diárias durante uma semana. A análise estatística mostrou que aqueles agentes causaram uma diminuição na microdureza da superfície do esmalte.

O peróxido de hidrogênio também é bastante estudado quanto aos seus efeitos na superfície do esmalte. Lewinstein *et al.* (1994) verificaram o efeito do peróxido de hidrogênio 30 % e de uma pasta de perborato de sódio, com peróxido de hidrogênio, em diferentes temperaturas e diferentes intervalos de tempo, na microdureza do esmalte e dentina. Os resultados indicaram que o tratamento com peróxido de hidrogênio 30 % reduziu a microdureza em ambos, esmalte e dentina. Esta redução só é estatisticamente significativa depois de 5 minutos de tratamento para a dentina e depois de 15 minutos de tratamento para o esmalte. O tratamento com a pasta de perborato de sódio com peróxido de hidrogênio não alterou a microdureza do esmalte e da dentina. Dessa forma, é sugerido que o uso do peróxido de hidrogênio em altas concentrações para o tratamento proposto seja limitado. O perborato de sódio mostrou ser uma agente clareador mais seguro, promovendo menos danos a superfície do esmalte.

1.5 Espectroscopia FT-Raman

A Espectroscopia FT-Raman tem sido amplamente aplicada atualmente no estudo de propriedades das resinas compostas, como por exemplo, o grau de conversão produzido por diversas fontes de fotoativação (SOARES *et. al.*, 2002). A utilização da Espectroscopia FT-

Raman apresenta diversas vantagens quando comparada com outras técnicas. A preparação das amostras é relativamente simples, não necessitando de nenhum método específico. É uma técnica não-destrutiva, possibilitando assim a análise da mesma amostra por outra técnica posteriormente.

A espectroscopia Raman é uma técnica de análise vibracional sensível aos modos vibracionais das moléculas. Nas resinas compostas, as bandas vibracionais de interesse são tipicamente as duplas ligações de Carbono (C=C) e as vibrações das ligações duplas de Carbono e Oxigênio (C=O) dos monômeros (SHIN *et al.*, 1993).

A espectroscopia Raman ocupa hoje uma posição destacada dentre as técnicas usadas no estudo investigação da interação da radiação eletromagnética com a matéria. As técnicas espectroscópicas de uma maneira geral fornecem informações detalhadas sobre os níveis de energia das espécies em estudo. No caso da espectroscopia vibracional, a grande vantagem está na maior riqueza de detalhes proporcionada pelos níveis de energia vibracionais, frente aos níveis de energia eletrônicos. Enquanto os espectros eletrônicos são constituídos por bandas largas e usualmente sem estrutura, os vibracionais representam a “impressão digital” das moléculas (FARIA, 1997).

Amostras de qualquer espessura e geometria podem ser investigadas porque a radiação incidente pode ser focada na amostra e a radiação dispersada coletada com coletores ópticos apropriados (SHIN *et al.*, 1993).

Com o surgimento de novos procedimentos na odontologia, estudos têm sido realizados na estrutura dental, utilizando a espectroscopia FT-Raman. Soares *et al.* (2007) investigaram a influência da irradiação do laser Er:YAG na dentina humana. Foram utilizados seis terceiros molares, de onde obteve-se discos de dentina com 4 mm de espessura, que foram irradiados com laser Er:YAG. Os discos de dentina foram preparados através da técnica de polimento com uma série de discos de papel de SiO₂ e depois foram lavados e limpos com ultra-som. As amostras foram divididas em 4 grupos: Grupo controle, que foi realizado ataque ácido por 15 segundos com ácido fosfórico 37%. Grupo I, onde foi feita aplicação de laser Er:YAG com 80mJ, 3Hz por 30 segundos. Grupo II, que foi realizada a aplicação do laser Er:YAG também, com 120 mJ, 3Hz por 30 segundos. Grupo III, com aplicação do laser Er:YAG, com 180 mJ, 3Hz por 30 segundos. A análise realizada com FT-Raman mostrou que o conteúdo orgânico e mineral da dentina foi menos afetado quando utilizado o ácido fosfórico 37% e o laser Er:YAG com uma densidade de potência de 80 mJ.

Seguindo a mesma linha de pesquisa, utilizado dentes humanos, Ko *et al.* (2005), através da combinação de tomografia óptica e espectroscopia FT-Raman, verificaram a

informação morfológica e especificidade bioquímica para detecção e caracterização de lesões de cáries incipientes encontradas em dentes humanos extraídos.

Componentes do esmalte têm sido relatados, para verificação da susceptibilidade das cáries de esmalte, através de técnicas não destrutivas, como FT-Raman. O objetivo deste estudo foi determinar os componentes do esmalte que se tornam mais susceptíveis a desmineralização *in vitro*. Através da Espectroscopia Raman por Transformada de Fourier foi usada para verificar a quantidade relativa de matéria orgânica e mineral do esmalte antes e depois terem sido submetidos por 8 dias de ciclagem de pH. Foram utilizados 30 blocos dentais, no qual foram subsequentemente desmineralizados e posteriormente analisados novamente. Uma posterior análise de microdureza foi realizada para quantificação da perda de mineral. Os resultados mostraram que todos os grupos apresentaram pouco carbonato e conteúdo orgânico após a desmineralização, concluindo que somente a quantidade de carbonato influenciou na susceptibilidade para desmineralização *in vitro* e que FT-Raman é uma técnica apropriada para selecionar amostras homogêneas de esmalte (RODRIGUES *et.al.*, 2005)

Através destes estudos, observamos que a Espectroscopia Raman ocupa hoje uma posição destacada dentre as técnicas usadas na investigação da estrutura microscópica da matéria, sendo estes materiais restauradores ou estrutura dental.

1.6 Resinas Compostas e Selantes de Superfície

A Odontologia, atualmente, vem dando uma grande ênfase a Dentística Restauradora, principalmente no que diz respeito à estética, que é cada vez mais exigida pelos pacientes. Assim, as pesquisas têm se direcionado no desenvolvimento de materiais que restabeleça mecânica, biológica e esteticamente a função do elemento dentário.

Desde seu surgimento, na década de 60, as resinas compostas têm derrubado inúmeras barreiras, passando a ser a primeira escolha em restaurações estéticas, substituindo os antigos cimentos de silicato e resinas acrílicas. Porém, mesmo com grandes avanços tecnológicos, tais como, melhoras no seu processo de fabricação; a escolha do tamanho; forma; concentração e tipo das partículas, ainda apresentam limitações e deficiências, dentre elas, a contração de polimerização, baixa resistência ao desgaste e instabilidade de cor.

As restaurações com resinas compostas, apesar de terem um resultado imediato satisfatório, com o tempo, sofrem degradação frente às condições do meio bucal. Os compósitos são susceptíveis ao desgaste e à alteração de cor, seja por infiltração marginal; descoloração intrínseca ou manchamento superficial. Além disso, não é difícil encontrar restaurações com falhas de contorno ou defeitos superficiais, o que as torna desarmoniosas com o remanescente dentário (DOMINGUES *et. al.*, 2001; PÍCOLO *et. al.*, 2002).

A absorção de água, característica desses materiais interfere na estabilidade de cor, ou seja, na sua resistência ao manchamento, e esse manchamento superficial também é influenciado pela porosidade da resina, que facilita a penetração dos corantes dos alimentos, dos resíduos do tabagismo, assim como propicia o acúmulo de placa dental, que, por sua vez, acelera a degradação superficial desse material. Trabalhos anteriores que avaliaram a estabilidade de cor das resinas compostas puderam comprovar que esses materiais são susceptíveis ao manchamento quando em contato com substâncias pigmentantes comuns na dieta, como café, chá e vinho, e não sofrem alteração de cor quando imersos em Coca-Cola. Além desses trabalhos *in vitro*, a observação clínica comprova essa ocorrência. Exposta a esses fatores desfavoráveis, porém cotidianos, as resinas podem ficar com sua estética comprometida e, sendo esta uma das suas principais propriedades, qualquer procedimento que venha a preservá-la é desejável (DOMINGUES *et. al.*, 2001).

Atualmente existem no mercado odontológico selantes superficiais, utilizados no intuito de melhorar a resistência da resina ao desgaste e à infiltração marginal. A justificativa para que essa proteção das resinas reduza o índice de desgaste é o fato de haver uma melhoria na textura superficial, já que o selante penetra nos microdefeitos superficiais (trincas causadas pelo polimento e/ou bolhas), tornando o material mais liso e "reforçando" essas estruturas enfraquecidas. Como o aumento da lisura superficial influencia positivamente a resistência ao manchamento, existe uma expectativa de que a aplicação de um selante resinoso de superfície possa favorecer esse aspecto das restaurações de resina (DOMINGUES *et. al.*, 2001).

As resinas compostas fotoativadas oferecem inúmeras vantagens, como: maior e melhor tempo de trabalho, o que é controlado pelo profissional; melhor estética; além de apresentarem uma evolução nas características de dureza, quando comparada aos sistemas anteriormente utilizados (MACHADO *et. al.*, 2002).

O tipo de resina composta utilizada, o grau de polimerização do material, a técnica de acabamento e polimento da restauração, o contato imediato do paciente com alimentos e substâncias corantes e o controle de placa são as principais causas da descoloração das resinas compostas (MAIXNER; SUSIN, 2001).

A longevidade das restaurações estéticas muitas vezes é comprometida pela descoloração do material restaurador, sendo causa, muitas vezes, da necessidade de substituição das restaurações. Uma observação visual da alteração de cor de corpos-de-prova da resina composta Z250, imersos durante diferentes períodos de tempo em alimentos providos de corantes se mostra propícia para a avaliação de possíveis alterações que podem influenciar o desempenho estético da restauração (MAIXNER; SUSIN, 2001).

Segundo Torres *et. al.* (2000), um dos problemas da polimerização é a contração que ocorre no corpo da resina, onde mesmo com altas forças de adesão obtidas através dos modernos sistemas adesivos, há formação de fendas marginais, especialmente nas margens cavitárias sem esmalte. As fendas são um caminho livre para a microinfiltração de fluídos orais, bactérias e seus produtos tóxicos, resultando em sensibilidade pós-operatória, manchamentos da interface e cáries recorrentes.

Diversas fontes de alteração de cor têm sido relatadas. A descoloração externa da resina composta pode ser resultado do acúmulo de placa envolvendo o manchamento. A degradação ou o manchamento na camada superficial da resina pode ser causado também por hábitos da dieta e pelo cigarro. Diferenças aparentes na cor também são causadas pela rugosidade superficial devido ao desgaste e aos procedimentos de polimento como também pela degradação química. (SCHULZE *et. al.*, 2003)

A descoloração nas camadas mais profundas da resina pode ser devida a reações físico-químicas internas do próprio material. Aminas terciárias contribuem para a descoloração com uma alteração no matiz, passando do mais claro para o mais amarelo. (SCHULZE *et. al.*, 2003) A água age como um carreador para os agentes pigmentantes durante o processo de sorção de água. A camada de oxigênio inibidora na superfície e as porosidades também podem provocar o manchamento. (SCHULZE *et. al.*, 2003)

A partir de 1980, diversos autores, propuseram a utilização de selantes sem carga e de sistemas adesivos para o fechamento de fendas marginais de restaurações de resina composta. Ratanapridakul, Leinffelder e Thomas (1989) em sua pesquisa concluíram que o acabamento e polimento geravam microfraturas na superfície das restaurações de resina composta, e que estas fragilizavam a restauração. Para atenuar estes inconvenientes foram idealizados seladores de superfície específicos para este fim. Estes materiais possuem baixa viscosidade e alta capacidade de molhamento, objetivando o fechamento das fendas e dos defeitos superficiais, redução da microinfiltração e diminuição do desgaste da superfície.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos materiais clareadores no branqueamento dentes humanos e bovinos e o efeito de soluções pigmentantes em materias, analisando alterações de cor e alterações químicas e de superfície, utilizando técnicas ópticas e de microanálise.

2.2 Objetivos Específicos

- **Estudo 1:** O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro*, alterações de cor através da fotorelectância e alterações morfológicas por meio da microdureza do esmalte dental hígido de dentes humanos, submetido a técnica de clareamento dental com peróxido de carbamida em duas concentrações, associado ao laser de Argônio ou lâmpada halógena.
- **Estudo 2:** Avaliar *in vitro*, por meio da técnica de Fotorreflectância a coloração do esmalte e FT-Raman a perda mineral da estrutural dental, após a técnica de clareamento vital de consultório com peróxido de hidrogênio a 35% em dentes bovinos.
- **Estudo 3:** Avaliar a eficácia dos selantes de superfície como método para prevenir o manchamento da resina composta, fotoativado por duas fontes de luz, sendo analisado por espectroscopia FT-Raman como método de estudo para degradação da resina composta. e por Fotorreflectância para a avaliação das alterações da cor da resina composta.

3 RESULTADOS

3.1 Artigo 1 - American Journal of Dentistry, v.18: p: 219-222., 2005

**ANALYSES BY PHOTOREFLECTANCE SPECTROSCOPY AND BY VICKERS
HARDNESS OF CONVENTIONAL AND LASER-ASSISTED TOOTH BLEACHING**

American Journal of Dentistry, v.18: p: 219-222., 2005

Ilene Cristine Rosia Cesar, Marcela Leal Redigolo, Priscila Christiane Suzy Liporoni e
Egberto Munin*

Analyses by photoreflectance spectroscopy and by Vickers hardness of conventional and laser-assisted tooth bleaching

Purpose: Human teeth were used in this *in vitro* study to evaluate the effects of two bleaching products developed by halogen or argon laser light. **Materials and Methods:** Twenty human embedded third molars were cut into 4 parts resulting in 75 useful specimens. The specimens were divided at random into 5 groups and submitted to the traditional power bleaching procedure for enamel. Group C was separated as a control group. Group 37L was exposed to a 37 % carbamide peroxide bleaching solution and developed with the 488 nm Argon laser radiation. The same solution was used in Group 37H but the bleaching was developed with an halogen lamp-based photopolymerizer. The 35 % carbamide peroxide was used in Groups 35L and 35H. One was developed as in Group 37L and the other as in Group 37H. The samples were analyzed under Vickers hardness tests and also submitted to a photoreflectance experiment. **Results:** It was observed that Group 37L presented more white spectra than Group 37H. However, Groups 35L and 35H showed the same results independently of the curing method used. Comparing both bleaching products, the 35 % carbamide peroxide was more efficient on its purposes than the other one. No significant difference between the two bleaching products was observed through Vickers hardness results.

Clinical significance: The Dental Bleaching Technique is a conservative procedure that presents satisfactory results when following the pre-established processes. The study of new procedures and protocols for dental bleaching might lead to the improvement of results in the existing techniques as well as minimize the patient discomfort. The increase of these techniques efficiency, safety and comfort can have consequences for a broader acceptance of the procedure.

Introduction

The current-day clinical practice of dentistry involves not only the prevention, diagnosis and treatment of teeth diseases but also the commitment with the final aesthetic result from all those procedures. This concern with cosmetic dentistry has stimulated the interest in new bleaching techniques¹⁻⁸.

Bleaching is an effective method for restoring the color of discolored vital teeth. The color and brightness of an object are related to the wavelength and to the amount of the incident light that is reflected. A dark tooth absorbs more light. When it becomes more white its enamel will present a smaller light absorption and as consequence a higher reflection⁸.

The traditional power bleaching procedure consists of the exposure of the enamel to a bleaching solution and to a specific light that will catalyze the reagent through the heat and the light radiation producing a change in color. The bleaching solution removes the organic pigments and the enamel becomes more white⁹.

The most traditional light source, which has been used for the activation of the whitening solution, is an halogen lamp-based photopolymerizer^{9,10}. However with the progress of the laser technology the Argon laser can be used for that purpose¹¹⁻¹³.

The purpose of this study is to evaluate the effects of 35 % and 37 % carbamide peroxides after conventional and laser-assisted tooth bleaching by photoreflectance spectroscopy and Vickers hardness analyses.

Materials and Methods

Two bleaching products were used in this experiment: a 35 % carbamide peroxide solution (Opalescence Quick - Ultradent USA) and a 37 % carbamide peroxide solution

(Whiteness Super - FGM). Twenty human embedded third molars freshly extracted at the University Dentistry Clinic were used in this study. The samples received a cervical-apical cut and were longitudinally cut into 4 parts resulting in 75 useful specimens. These fragments had its enamel area reduced to 16 mm² by using a diamond saw and kept in 100 % relative humidity at 37 °C before, during and after the bleaching treatment. The specimens were divided at random into 5 groups and submitted to the bleaching procedure for enamel as described in table 1. Group C was separated as a control group. Group 37L was exposed to a 37 % carbamide peroxide bleaching solution and developed with the 488 nm Argon laser radiation. The same solution was used in Group 37H but the bleaching was developed with an halogen lamp-based photopolymerizer. The 35 % carbamide peroxide was used in Groups 35L and 35H. One was developed as in Group 37L and the other as in Group 37H.

The samples were individually held in a piece of sticky red wax and the bleaching solutions were applied to the samples using a squirt. The process was activated with an halogen lamp-based photopolymerizer or with the 488 nm line of an Argon laser, model Stabilite 2017 from Spectra Physics. The laser power was settled to 200 mW and was applied to the samples during 30 s with 4 minutes intervals performing a 40 min duration for the whole procedure. For the halogen lamp-based photopolymerizer (Degussa – Degulux soft-start model) the application followed a similar procedure with 240 mW of power and the light was applied to the samples during 2 min followed by 4 minutes intervals. The bleaching treatment was done with a 7-days-interval between the sessions. These time intervals were chosen based on the manufacturer recommendations and the published literature works.^{3,9,13}

All samples were submitted to a photorefectance spectroscopy. The photorefectance experiment employed a fiber probe with a center core of fibers used for excitation while the ring of outer fibers was used for reflected light collection as shown in figure 1. The excitation core, with a 650 µm diameter, consisted of 19 closed packed fibers. The collection ring, with

a 1050 μm diameter, contained 25 fibers. The fiber diameter for both excitation core and collection ring was 108 μm and the fiber probe was positioned 3 cm from the sample under study in a 90° incidence angle in relation to the sample's surface. A 150 W EJV quartz halogen lamp was used as a light source to illuminate the samples through the fiber cable. The amount of white light coupled into the excitation fibers and delivered to the sample was 4 mW. The reflected light collected by the ring of outer fibers was coupled into a spectrometer (Oriel Instruments – MS 257). An opal glass diffuser was used as a white object reference. Photorefectance measurements were performed before and after the bleaching treatment to compare the effectiveness of the products.

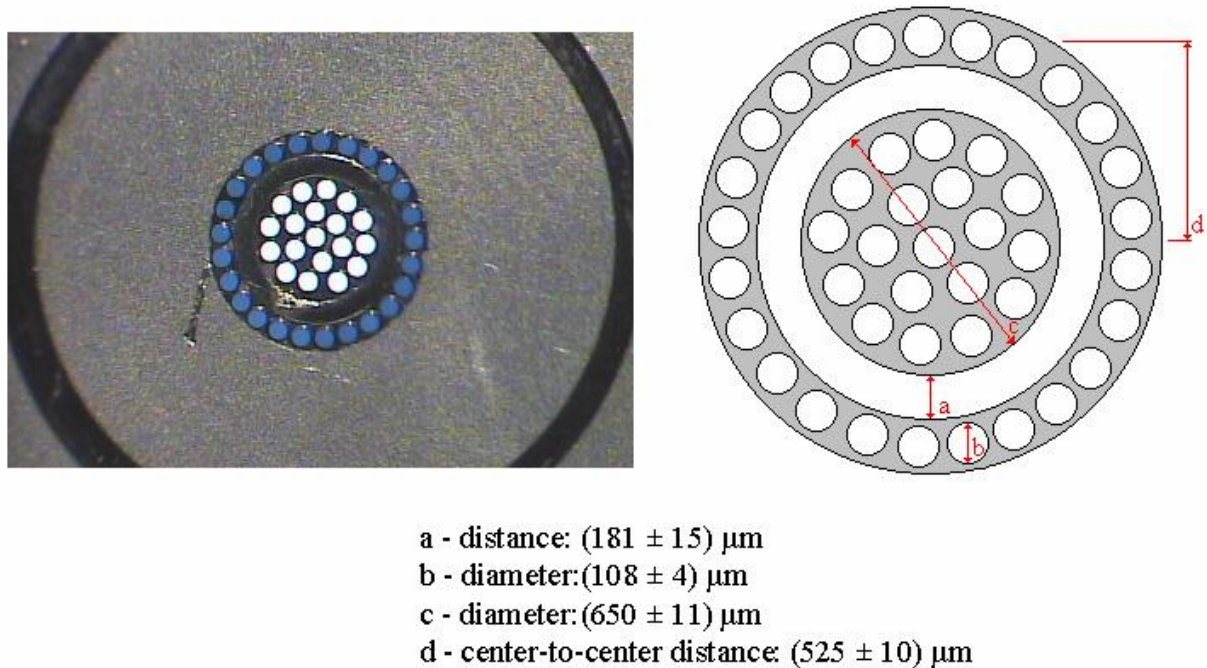


Figure 1: Representation of the fiber probe used in the photorefectance experiment. The inner-core fibers are responsible for the excitation of the samples while the external fiber ring collects the photorefectance

For the Vickers hardness tests, the samples were invested in a polyester resin (T208 – VALGLASS Comércio e Indústria Ltda) according to the sample groups already described. Five circular heavy silicon molds received a first resin layer (10 g of resin for 8 drops of activator), in which the samples were distributed. A second polyester resin layer was poured into the mold (40 g of resin for 25 drops of activator), totally covering the samples. Fourteen samples were placed in each mold and properly identified accordingly to their groups.

The resin surface was initially polished with a grinding and polishing machine (Knuth Rotor-Struers) using an aluminum-oxide abrasive wet-sandpaper with 600 and 1200 grits. Then, the samples were polished with a rotary electric grinding and polishing machine (DP-Struers) with 6 μm grit diamond paste to produce a very flat surface. This procedure was carefully monitored to avoid excess removal of dental enamel. The finish polishment was done in a 300 rpm rotation using a rotary electric grinding and polishing machine with a colloidal silica suspension.

The Vickers hardness study has been carried out using a diamond pyramid indenter (Future Tech – Digital Microhardness Test FM). Each sample received four indentations on its enamel surface using a small testing load of 50 gf during 10 seconds, and the mean value was calculated. The distance between the indentations was 25 μm .

Results

Typical measured photoreflectance spectra are depicted in Fig. 2. The data are presented as relative intensity as a function of the wavelength. The relative intensity spectra were obtained dividing the reflectance spectra by a referential spectrum collected by using an opal glass diffuser.

The lower intensity curve in all graphs (Fig. 2) corresponds to the photoreflectance spectrum before the beginning of the bleaching treatment. As the samples were submitted to

the bleaching sessions, that curve shifts toward the white reference line (intensity 1). In resume, the second curve (from the bottom to the top) represents the photoreflectance spectra after the first bleaching session, while the third curve was measured after the second session.

Comparison of the photoreflectance spectra for both bleaching products shows that the 35 % carbamide peroxide (Groups 35H and 35L) was more efficient on its purposes. After the second session, the reflection spectra are closer to the white reference spectrum than the results obtained with the other peroxide.

Proper statistical analyses described by the area under the curve were applied to all photoreflectance results. This area was found by calculating the area between the curve under study (before treatment, after first session, after second session or the white reference) and the horizontal axis. This calculation can be done considering the following defined integral as a function of the wavelength, in nanometers:

$$A = \int_{430}^{630} I(\lambda) d\lambda$$

The statistical results obtained for the photoreflectance spectra are presented in table 2. The mean area for each group under study is represented here. Each one of these areas represents a percentage of the white reference, that is, the maximum area that could be achieved.

Comparing the solution activation method for the 37 % carbamide peroxide, we can observe that the Argon laser was more efficient in the bleaching treatment than the halogen lamp. Probably this efficiency is related to the high absorption of the bleaching solutions at the 488 nm Argon laser line, while the lamp presents a broader emission spectrum, which might not match completely the absorption band of the peroxides solutions.

Table 3 summarizes the mean values for the Vickers hardness results. The Standard Deviation was calculated and no significant differences were observed from the results.

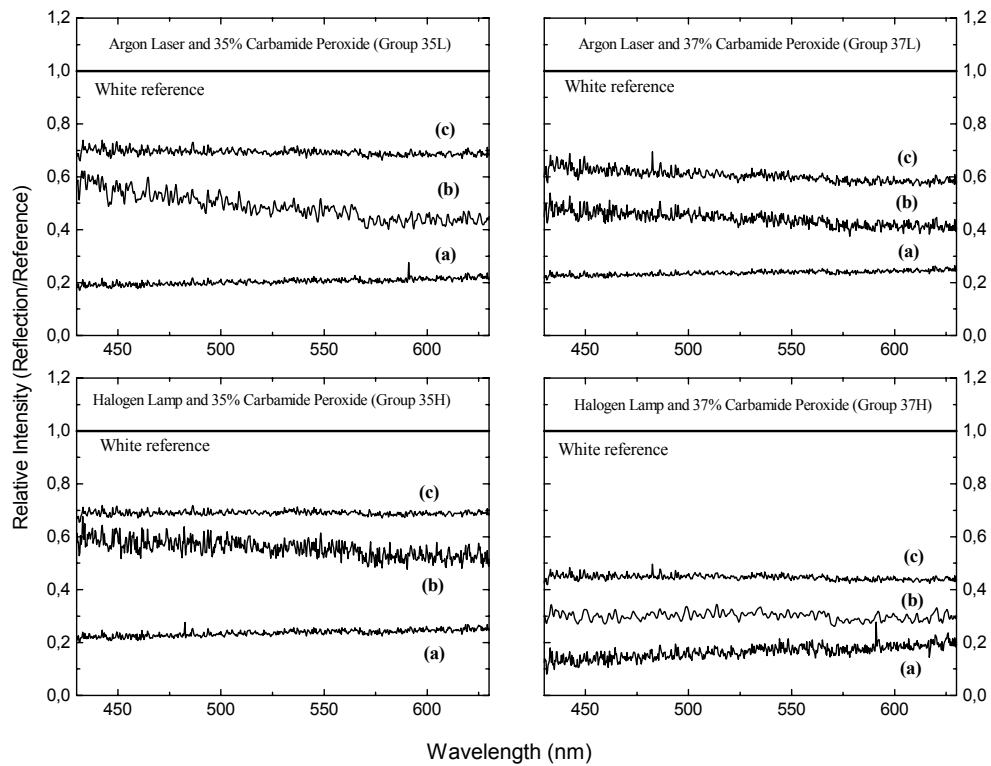


Figure 2: A typical measured photorefectance spectra for groups 35L, 37L, 35H and 37H. The lower intensity curve in all graphs (curve a) corresponds to the photorefectance spectrum before the beginning of the bleaching treatment. The second curve (b) from the bottom to the top represents the spectrum after the first bleaching session, while the third curve (c) was measured after the second session.

Table 1: Bleaching procedures to each sample group.

Group	Bleaching product	Method	Duration of the application	Total duration of the session
C	Control			
37L	37 % carbamide peroxide	Argon laser	30 s	40 min
37H	37 % carbamide peroxide	halogen lamp	2 min	40 min
35L	35 % carbamide peroxide	Argon laser	30 s	40 min
35H	35 % carbamide peroxide	halogen lamp	2 min	40 min

Table 2: Statistical results for the analyses of the photoreflectance spectra. The area under each reflectance curve was calculated and the percentage represents the bleached samples curves departure from the ideal white color. The standard deviation (SD) is also presented.

Group	Area before the bleaching treatment (area \pm SD) area unit	Area after the first bleaching session (area \pm SD) area unit	Area after the second bleaching session (area \pm SD) area unit
37L	78,15 \pm 3,38 (77 %)	149,50 \pm 2,77 (56 %)	210,66 \pm 2,04 (38 %)
37H	57,76 \pm 3,42 (83 %)	105,33 \pm 2,83 (69 %)	156,30 \pm 2,07 (54 %)
35L	74,75 \pm 3,25 (78 %)	166,49 \pm 2,81 (51 %)	237,85 \pm 1,98 (30 %)
35H	81,55 \pm 3,19 (76 %)	190,28 \pm 2,73 (44 %)	234,45 \pm 2,01 (31 %)
C	339,782 (0 %)	339,782 (0 %)	339,782 (0 %)

Table 3: Vickers Hardness results (mean value \pm standard deviation) for each group of samples, after three bleaching sessions.

Groups	Carbamide Peroxide	Bleaching Process	Vickers Hardness (MV \pm SD)
Group C	-----	Control	(414 \pm 5) gf/mm ²
Group 37H	37%	Lamp	(416 \pm 2) gf/mm ²
Group 37L	37%	Argon Laser	(415 \pm 4) gf/mm ²
Group 35H	35%	Lamp	(415 \pm 3) gf/mm ²
Group 35L	35%	Argon Laser	(415 \pm 3) gf/mm ²

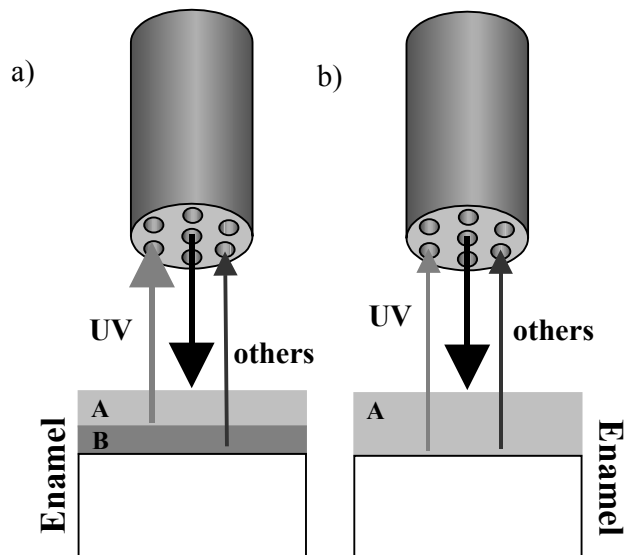


Figure 3: Representation of the light-tissue interaction (a) before and (b) after the bleaching process. The central arrow in both pictures represents the excitation beam directed by the fiber to the sample. The regions A and B are the enamel superficial layers where the bleaching solutions are active. The external arrows represent the light reflected by the sample: shorter wavelengths (ultraviolet region - UV) and other wavelengths (red, infrared, etc - others).

Discussion

Considering all the obtained photoreflectance spectra for the samples irradiated by the commercial photopolymerizer, the group treated with the 37 % carbamide peroxide (group 37H) didn't present a final bleaching result with the same effectiveness as that treated with 35 % carbamide peroxide (group 35H). This result can be observed at Fig. 2, where the photoreflectance spectra for group 35H are closer to the white reference than those for group 37H. Similar conclusion can be reached from the results obtained for the groups irradiated with the Argon laser.

When comparing the solution activation method (lamp or laser) for the 35 % carbamide peroxide, no significant difference can be observed. The same conclusion cannot be attributed to the 37 % carbamide peroxide groups. The Argon laser presented the best results as a bleaching method for this solution.

It's also noticed that the shorter wavelength side of the spectral curves (ultraviolet region - UV) in Fig. 2 is more sensitive to the first treatment session, independently of the activation method or the bleaching solution, than the longer wavelength side of the photoreflectance curves (red/infrared regions – IR). This peculiar interaction behavior might be explained by using a two-layer scattering media model, together with the geometrical configuration of our fiber optical probe. It is reasonable to consider that the first bleaching

section acts only at a finite depth, forming a shallow whitened layer with reduced light absorption while the sample remains unchanged at higher depths. The result is a two-layer scattering media, as represented in Fig. 3a, in which the top layers, next to the enamel surface (layer A), had been altered by the first bleaching session while the bottom layer (layer B) remains as dark as before the treatment started. Each of these regions can be characterized by their scattering and absorption coefficients. The proposed model of a two-layer scattering media is also supported by the fact that the penetration depths for the peroxides and for the activation light are not necessarily the same. If the tooth is too dark, even though the bleaching products have a good diffusion through the enamel, the activation light will be constrained to the shallow outer layer due to the absorbing pigments, and will act at higher depths only after the first absorbing pigment layer is cleared up.

For the photorefectance measurements, white light from the excitation optic fiber illuminates the enamel. The scattering process is wavelength dependent. The mean free path gets shorter as the wavelength shifts toward the blue side of the spectrum. Thus, shorter wavelengths will be more strongly scattered, diffusing more efficiently through the layer A in Fig. 3a. Such a distinct diffusion behavior will favor shorter wavelengths of reaching the collection fibers, raising the signal at the blue side of the spectra shown in Fig. 2. Conversely, the longer scattering mean free paths for the longer wavelengths will allow them to travel deeper inside the sample reaching the absorbing layer marked as B in Fig. 3a. The absorption of longer wavelengths in layer B leads to the reduced signal intensity at the red side of the spectra measured right after the first bleaching session, as compared to the blue side of the curve.

After the second bleaching session, layer A gets thicker as illustrated in Fig. 3b. It is expected that if the thickness of the bleached layer A gets much larger than the scattering mean free path for any of the analyzed spectral component of the light, any interference of

deep absorption layers should be equally distributed throughout the probed spectral window. The broadening of the bleached layer A with repeated bleaching sessions leads to flattened spectra as shown in Fig. 2.

The Vickers hardness results show that the bleaching treatment using 35 % or 37 % carbamide peroxide did not affect the enamel surface hardness, independent of the solution activation method (laser or photopolymerizer). The data were statistically analyzed and the results confirm that the enamel hardness is preserved.

Some results from previous works in literature^{14,15} presented changes in the hardness of the enamel surface after bleaching treatment using 10 % carbamide peroxide. Nevertheless this difference may not have a clinical relevance because the mineral losses caused by the treatment can be replaced by the saliva¹⁴.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Sokki Sathaiah for the use of his laboratory facilities (the Argon laser), the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP) project number # 96/05590-3 for their valuable support and the Centro Técnico Aeroespacial – CTA, for the use of the diamond pyramid indenter (Vickers hardness test).

References

1. Fay RM, Servos T, Powers JM. Color of restorative materials after staining and bleaching. *Oper Dent* 1999; 24; 292-296.
2. Zwahlen BJ, Fife CG, Ludlow TN, *et al.* Absorbance of light and heat by tooth bleaching agents. *J Dent Res* 1998; 77; 134-134 (Sp. Iss. A).
3. Akal N, Over H, Olmez A, Bodur H. Effects of carbamide peroxide containing bleaching agents on the morphology and subsurface hardness of enamel. *J. Clin Pediatr Dent.* 2001; 25(4); 293-296
4. Seghi R R, Denry I. Effects of external bleaching on indentation and abrasion characteristics of human enamel in vitro. *J Dent Res* 1992; 71(6); 1340-1344
5. Lopes GC, Bonisconi L, Baratieri LN, Vieira LC, Monteiro D Jr. Effect of bleaching agents on the hardness and morphology of enamel. *J Esthet Restor Dent* 2002; 14(1); 24-30
6. Cimilli H, Pameijer CH. Effect of carbamide peroxide bleaching agents on the physical properties and chemical composition of enamel. *Am J Dent* 2001; 14(2); 63-66
7. Oltu U, Gurgan S. Effects of three concentrations of carbamide peroxide on the structure of enamel. *Journal of Oral Rehabilitation* 2000; 27; 332
8. Kwon YH, Huo MS, Kim KH, *et al.* Effects of hydrogen peroxide on the light reflectance and morphology of bovine enamel. *J Oral Rehabil* 2002; 29; 473-477.
9. Feinman R, Madray G, Yarborough D. Chemical, optical and physiologic mechanisms of bleaching products – a review. *The Bleaching Report* 1991; 3; 32-37.
10. Wattanapayungkul P, Yap AU. Effect of in-office bleaching products on surface finish of tooth-colored restorations. *Oper Dent* 2003; 28(1); 15-9
11. Jones AH, Diaz-Arnold AM, Vargas MA, *et al.* Colorimetric assessment of laser and home bleaching techniques. *J Esth Dent* 1999; 11; 87-94.

12. Overloop K, Blum R, Verheyen P. Esthetic dentistry with smartbleach: An Overview of clinical cases. *J Oral laser applications* 2002; 2;129-134
13. Garber AD. Dentist-monitored bleaching: a discussion of combination and laser bleaching. *J Am Dent Assoc* 1997; 128; 26-30.
14. Mccracken M, Haywood VB. Effects of 10 % carbamide peroxide on subsurface hardness on enamel. *Quintessence Int* 1995; 26; 21-24
15. Murchinson DF, Charlton DG, Moore BK. Carbamide peroxide bleaching: effects on enamel surface hardness and bonding. *Oper Dent* 1992; 17; 181-185

3.2 Artigo 2 - *Photomedicine and Laser Surgery* , v.xx, p.xx, 2008

Artigo aceito na Photomedicine and Laser Surgery

**FT-Raman and Reflectance studies on dental enamel bleached with hydrogen peroxide
activated by LED/Laser system.**

Ilene Cristine Rosia Cesar, Luís Eduardo Silva Soares, Leandro Procópio Alves, Airton
Abrahão Martin, Egberto Munin, e Priscila Christiane Suzy Liporoni.

**FT-Raman and Reflectance studies on dental enamel bleached with hydrogen peroxide
activated by LED/Laser system.**

ILENE CRISTINE ROSIA CESAR, D.D.S., M.S.^{1,4,*}

LUÍS EDUARDO SILVA SOARES, D.D.S., PhD^{2,4}

LEANDRO PROCÓPIO ALVES, M.S.¹

AIRTON ABRAHÃO MARTIN, Phys, PhD²

EGBERTO MUNIN, Phys, PhD¹

PRISCILA CHRISTIANE SUZY LIPORONI, D.D.S., PhD^{3,4}

¹Laboratory of Biomedical and Non-Linear Optics, Research and Development Institute – IPD, Vale do Paraíba University - UNIVAP, São José dos Campos, São Paulo, Brazil.

²Laboratory of Biomedical Vibrational Spectroscopy, Research and Development Institute – IPD, Vale do Paraíba University - UNIVAP, São José dos Campos, São Paulo, Brazil.

³Coordinator of the Master and PhD program in Dentistry, Department of Restorative Dentistry, Universidade de Taubaté UNITAU, São Paulo, Brazil.

⁴Department of Dentistry, UNIVAP, Vale do Paraíba University - UNIVAP, São José dos Campos, São Paulo, Brazil.

Original research paper

Running title: Hydrogen peroxide effects on enamel

ABSTRACT

Objective: Reflectance and FT-Raman spectroscopy have been used in this *in vitro* study to evaluate the effects of 35% hydrogen peroxide bleaching on bovine teeth. *Background Data:* Numerous previous investigations have shown that dental components can be modified by hydrogen peroxide. However, more studies are necessary to comprehend its effects. *Materials and Methods:* Forty bovine enamel fragments (4.0 x 4.0 x 4.0 mm) were divided into four experimental groups according to the hydrogen peroxide gel manufacturer's application: G1-Whiteness HP Maxx, G2-Whiteness HP, G3-Whiteform- Perox Red Form, G4-Opalescence Xtra. The analyses before treatments were used as control. All groups were activated with an LED/laser system. The bleaching treatments were performed in 2 sessions with a 72 h interval between sessions. The reflectance and Raman analyses of the enamel samples were performed before and after bleaching. *Results:* Enamel reflectance was significantly greater after the bleaching in group G3 than in groups G1, G2 and G4 ($p < 0.01$). FT-Raman spectroscopy data showed no significant chemical changes in the inorganic components for tested groups ($p > 0.05$). Hydrogen peroxide gel caused significant reduction of the dental organics associated with type I collagen vibration only in group G3 ($p < 0.05$). *Conclusion:* Under the conditions of this study, 35% hydrogen peroxide Whiteform – Perox Red Form gel, exhibited great bleaching potential. This highly concentrated hydrogen peroxide gel significantly changed the reflectance of enamel and dental organics without significant chemical changes in enamel phosphate and carbonate content.

INTRODUCTION

Tooth bleaching has been reaching great popularity as a result of the esthetic demands imposed by society; it has been indicated for teeth discolored by aging, trauma, endodontic treatment, ingestion of colored foods and beverage, tobacco, and naturally discolored teeth.¹ Tooth bleaching can be performed in vital or non-vital teeth. In vital teeth, hydrogen peroxide and carbamide peroxide might be used in the dental office or by patients under the dentist's supervision.¹⁻³

The contemporary tooth bleaching technique is based primarily on the oxidation by hydrogen peroxide or one of its precursors, and those are often used in combination with an activating agent such as heat or light.⁴⁻⁵ To accelerate the bleaching process, the bleaching agent can be additionally heat-activated. This idea of power bleaching dates back to 1918, when Abbot reported the use of high intensity light to increase the temperature of hydrogen peroxide. Mostly, application of heat, light or lasers is used to increase the temperature of a bleaching agent applied to the tooth surface.⁶

Tooth colour measurement are currently assessed using a wide range of measurement methods divided into subjective (visual) and objective (instrumental) assessment.⁷ Instrumental measurement devices, like reflectance spectrophotometers, colorimeters, digital image analysis systems including quantitative light-induced fluorescence (QLF), represent nowadays a supplementary adjunct to visual tooth colour evaluation. The main difference between them is that spectrophotometers measure the reflectance of light within the entire visible spectrum, whereas colorimeters evaluate the reflected light only through three wavelengths namely red, green and blue.⁸

The effects of bleaching agents on teeth, in terms of chemical modifications, have been molecularly evaluated by many researchers.⁹⁻¹² However, some studies use laboratory

products, and others use prototype products.⁹⁻¹² As an alternative measurement technique, Raman spectroscopy is increasingly being recognized as a significant analytical method for biomedical applications. Raman spectroscopy data contain a significant amount of important information regarding the composition and structure of materials at the molecular level.

The analysis of the Raman spectrum of dental tissues can provide information about the relative concentration of the phosphate and carbonate groups associated with the hydroxyapatite molecule.^{13, 14} The vibration modes of PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , and OH^- groups can be studied by Raman spectroscopy. The frequency and the band shape of the most prominent ν_1 PO_4^{3-} depend on the local mineral environment and therefore change with ionic incorporation and crystallinity. Meanwhile, the intensity of ν_1 PO_4^{3-} is linearly proportional to phosphate group concentration within the hydroxyapatite molecule, and it thus can be used to analyze changes in the phosphate group concentration.⁴⁰ Therefore, analysis of the concentration of phosphate within the enamel is a good indicator of the degree of mineralization.^{13, 14}

To the best of our knowledge, analytical studies at the molecular level to evaluate the chemical effects of hydrogen peroxide bleaching on enamel components associated with reflectance analysis have not been performed. Therefore, the objectives of this study were to assess the effects of bleaching with commercial products activated by LED/Laser system, on the chemistry and color on enamel before and after treatment, as evaluated by Fourier Transform (FT)-Raman and reflectance spectroscopy, respectively.

MATERIALS AND METHODS

Sample Preparation

This study was approved by the Ethics Committee of the University of Vale do Paraíba (A006/2006/CEP). Twenty bovine teeth were used in the present study. All teeth were

from animals of the same age and lot and that had received the same feed. After extraction, teeth were cleaned and stored in an aqueous solution of 0.1% thymol for 24 hours. They were then submitted to manual debridement with a periodontal curette to remove organic debris and polishing with a pumice stone paste (S.S.White – Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and water using a Robinson brush (Viking-KG Sorensen, Barueri, SP, Brazil) and a low speed handpiece (KaVo do Brasil SA, Joinville, SC, Brazil).

The crown was separated from the root with a cervical-apical cut and was longitudinally sectioned into two portions, resulting in 40 blocks. These fragments had their enamel/dentine area reduced to 4.0 x 4.0 with a thickness of 4.0 mm using a diamond saw (Isomet 1000-BUEHLER, Lake Bluff, IL, USA). The prepared samples were kept at 100% relative humidity at 37°C in a culture kiln (502-1, FANEM, São Paulo, SP, Brazil) and stored in artificial saliva during bleaching treatment. The specimens were divided at random into four groups containing 10 samples per group. We used four bleaching gels based on 35% hydrogen peroxide: G1 - Whiteness HP (FGM, Joinville, SC, Brazil), G2 - Whiteness HP MAXX (FGM, Joinville, SC, Brazil), G3 - Whiteform – Perox Red Form gel (Fórmula & Ação, São Paulo, SP, Brazil), and G4 - Opalescence Xtra gel (Ultradent, Utah, USA) (Table 1).

Bleaching Protocol

Each group was treated with the appropriate whitening gel in accordance with the manufacturer's instructions. The whitening gel was applied as a 0.5 mL thick layer with an syringe on the enamel of each block. This procedure was referred to initial application. The gel was first placed onto the sample and light-activated with an LED/LASER Brightness System (Kondortech Equipamentos Odontológicos Ltda, São Carlos, SP, Brazil). The LED/LASER system features used were as follows: a power of 240 mW (LEDs: 70 mW and

Diode laser: 170 mW), a power density of 5.4 mW/mm², an LED wavelength of 465.5 nm, a LASER wavelength of 790 nm, and a spot size of 7.5 mm. The gel was photoactivated for 30 seconds totaling 10 minutes of application for each sample. The gel was then removed, and the sample was washed with distilled water. This procedure was then repeated twice more. During and after treatment, the samples were stored in 5 ml of artificial saliva that was changed daily in the culture kiln at 37°C. The artificial saliva contained 20ml/sample – 1.5mM Ca, 0.9mM P, 0.1 buffer solution, Tris and pH 7.0.^{15,16}

The bleaching sessions were then performed in the groups as previously described, with a 72-h interval between sessions.

Table 1. Whitening solution composition and pH value according to the manufacturer's information

<i>Group</i>	<i>Product</i>	<i>Whitening gel</i>	<i>Composition</i>	<i>pH value</i>
G1	Whiteness HP Maxx, (FGM, Joinville, SC, Brazil)	35% hydrogen peroxide	thickening, glycol, water	6.0-7.0
G2	Whiteness HP (FGM, Joinville, SC, Brazil)	35% hydrogen peroxide	thickening, glycol, inorganic filler, water deionizade	6.0-7.0
G3	Whiteform – Perox Red Form gel (Fórmula & Ação, São Paulo, SP, Brazil)	35% hydrogen peroxide	No information	3.0-5.0
G4	Opalescence Xtra, (Ultradent, South Jordan, Utah, USA)	35% hydrogen peroxide	No information	4.5

Reflectance Analysis

The bovine dental blocks were analyzed using reflectance spectroscopy to evaluate changes in enamel/dentine photoreflectance. Enamel sample spectra were obtained before and after the bleaching procedure. The reflectance system was composed of one spectrometer

(Oriel Instruments - Model 77702, Stratford, CT, USA), one Teflon integrating sphere, one fiber-coupled halogen light delivering 4 mW power at the fiber tip as a source of white light (ROI - Ram Optical Instrumentation - model 150 Illuminator, Chicago, IL, USA), two 600 μm diameter optical fibers for excitation and signal collection, and one computer for data acquisition.

Before the first spectrum was captured, the system was calibrated, using the He-Ne laser (632.8nm, 594nm) associated with a mercury lamp (435.8nm, 546.1nm, 576.9nm and 579nm). To minimize measurement errors from any instrumental instability, the signal of background and the signal from the reference were collected using a white diffuser (TeflonTM) before the measurements and every 10 minutes, to account for long-term instrumental drift.

The number of signal accumulations was standardized at 100 and the CCD exposure time was set to 500 ms (0.5 s). Once the spectrometer was set to work in the reflectance mode, each sample spectrum was automatically compared with the reference to give the sample reflectance spectrum. All spectral measurements were background-corrected. The diffuse reflectance spectrum was recorded in the 400–700 nm spectral range. The Microcal OriginTM (Microcal Software, Inc., Northampton, MA, USA) software was used for spectral data processing, and the areas under the curves were calculated. The areas under the curves gives a relative measure of the amount of light returned from the sample, so the larger the area under the reflectance curve the larger is the reflection of light by the sample.¹⁷⁻²¹

Fourier Transform Raman Spectroscopy (FT-Raman)

The molecular measurements were carried out on an FT-Raman Spectrometer RFS 100 (Bruker Optics Inc., Karlsruhe, Germany). The enamel surface was analyzed before and after the bleaching treatment. Because Raman spectra were taken from all specimens before

treatment, they all served as their own negative control. The excitation laser was an Nd:YAG laser operating at a wavelength of 1064.1 nm. Laser power output was maintained at 100 mW after checking that samples did not photodecompose. A liquid-cooled germanium detector recorded the Raman spectra. The specimens were examined on a sampling plate fixed by double-sided adhesive tape, perpendicular to the laser beam. One measurement was carried out upon the middle enamel surface with a 1 mm² scanning area and a ~3 min integration time, at room temperature.²² Specimen spectra were obtained by accumulating 100 scans with spectral resolution of 4 cm⁻¹.²⁵ Altogether, 80 spectra were obtained. The lower limit of laser penetration depth of our Raman experiments was ~500µm.

Data Manipulation

To verify intra-specimen variation, FT-Raman spectra were recorded in three different regions in two specimens of each group. The observed spectral patterns were exactly the same, and there were no differences after spectra intensity analysis application. Thereafter, it was established that obtaining one measurement for each specimen was acceptable.

OPUS software (version 4.2, Copyright# Bruker Optics GmbH 1997-2002, Billerica, MA, USA) was the dedicated software used for data acquisition. Post-processing analysis for the qualitative and semi-quantitative spectral analysis was performed. The spectra in the region of interest, between 300 and 3200cm⁻¹, were analyzed by analytical software (Microcal Origin 5.0 Software, Inc., Northampton, MA, USA). The luminescence background was removed by baseline correction for each spectrum collected before relative comparison studies of organic and inorganic content were performed. All spectra were processed by fitting the Raman vibrational stretching mode at 960, 1071, 1665 and 2940 cm⁻¹. The band

fitting of characteristic peaks was performed using a combined Gaussian/Lorentzian function to determine the exact position, peak intensities and areas.

Statistical Analysis

The statistical analysis was performed to test the significance between each group comparing the values of the reflectance and Raman relative areas (before and after bleaching). The one-way analysis of variance (one-way ANOVA) followed by t- test ($p < 0.05$) were performed to verify statistical significance between tested data sets.

RESULTS

Reflectance Spectra Results

Typical measured reflectance spectra before and after bleaching are shown in Figure 1. The data are presented as the relative intensity as a function of the wavelength.

The ANOVA and t-test statistical analysis, using the difference of before and after relative areas under the reflectance curves (Table 2), revealed that all groups bleached to a significant extent ($P < 0.01$). Statistical comparisons that considered only the after-bleaching area values of the reflectance spectra showed that the dental bleaching was effective in all groups. However, G3 the values of reflectance were more effective than the other products used. The effectiveness order was $G3, G1 \text{ and } G2 > G4$ ($P < 0.01$). G1 and G2 after-bleaching area values were not significantly different.

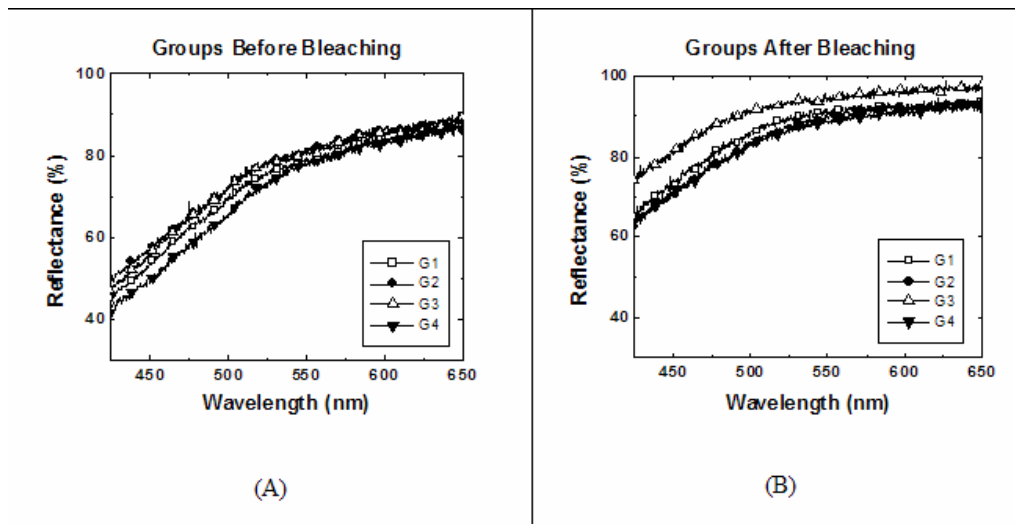


FIGURE 1

FIG. 1. Typical measured reflectance spectra for bovine dental samples before (A) and after (B) dental bleaching, for the experimental groups: Whiteness HP MAXX, FGM (G1); Whiteness HP, FGM (G2); Whiteform – Perox Red Form, Fórmula & Ação (G3); and Opalescence Xtra, Ultradent (G4).

Table 2. Mean values and standard deviations (sd) of the relative area (arbitrary units) of the spectra obtained by reflectance analysis before (b) and after (a) bleaching treatment

	G1	G2	G3	G4
Before	16457 (1023) ^{*a}	17090 (878) ^{*a}	16891 (633) ^{*a}	16002 (1392) ^{*a}
After	19448 (962) ^{*a}	19104 (937) ^{*a}	20585 (825) ^{*b}	18963 (910) ^{*c}

t-test showed that means followed by different superscript letters in the row differ

($P < 0.05$). All groups exhibited significant ($p < 0.05$) differences before and after

bleaching (groups marked with asterisks *).

FT-Raman Spectra Results

The typical Raman spectra for the normal and bleached bovine enamel in the region of 100-3300 cm^{-1} after luminescence background removing are shown in Figure 2. The spectra have been vertically shifted for clarity. No missing or new Raman peaks were found after bleaching. In our study, the vibration modes of dental organics as collagen were detected because the characteristic penetration depth of our experiments was $\sim 500\mu\text{m}$ and thus the signal was dominated by Raman scattering from the bulk rather than from the submicron surface layer of enamel.

The intense peak at 960cm^{-1} is associated with the phosphate (PO_4^{3-} ν_1) stretching vibration in the mineral apatite component of enamel, and the peak at 1071 cm^{-1} is attributed to carbonate (CO_3^{2-} ν_1) vibrations.^{12, 23, 24} The peaks at 431 and 581 cm^{-1} are related to PO_4^{3-} ν_2 and PO_4^{3-} ν_4 modes of phosphate, respectively.^{12, 23, 24} The peaks at 1247 , 1451 , 1667 , and 2942 cm^{-1} are attributed to the dental organics, specifically amide III, C-H bending vibrations, amide I (C=O), and C-H stretching vibrations, respectively.²⁴

The mean values and standard deviations of the relative areas of the Raman peaks for the enamel before and after bleaching are shown in Table 3. For statistical analysis, the areas of the phosphate (960 cm^{-1}), carbonate (1070 cm^{-1}), type I collagen (1660 cm^{-1}), and C-H bonds of organic matrix (2940 cm^{-1}) peaks were compared. The relative areas of the inorganic and organic components in all four groups showed changes after bleaching. Those changes were not statistically significant ($p > 0.05$) as determined by a paired-samples t-test comparison except for type I collagen in G3, which was significantly different ($p < 0.05$).

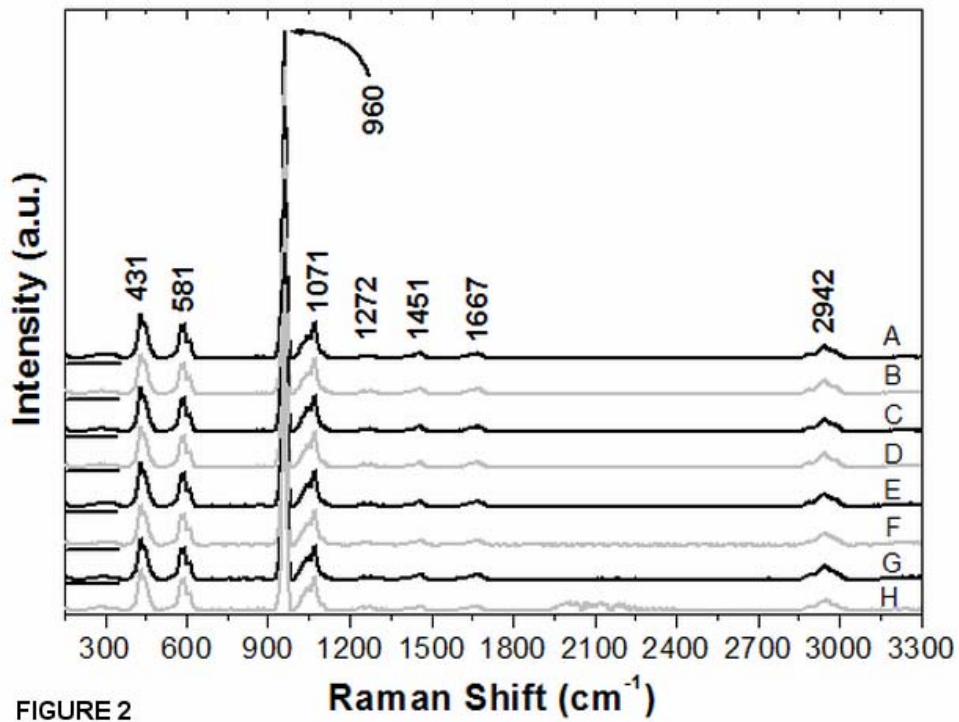


FIG. 2. FT-Raman spectra (raw spectra) with the main vibrational modes before (black lines) and after bleaching (gray lines) for: G1 before bleaching (A); G1 after bleaching (B); G2 before bleaching (C); G2 after bleaching (D); G3 before bleaching (E); G3 after bleaching (F); G4 before bleaching (G); and G4 after bleaching (H).

Table 3: Mean values and standard deviations (SD) of the relative area (arbitrary units) of the peaks related to phosphate (960 cm^{-1}), carbonate (1070cm^{-1}), type I collagen (1667cm^{-1}) and the organic matrix (2944cm^{-1}) obtained by FT-Raman spectroscopy before (b) and after (a) bleaching treatment (n=10)

Components	G1_B	G1_A	G2_B	G2_A	G3_B	G3_A	G4_B	G4_A
Phosphate	16.76	16.87	16.88	16.40	16.67	16.78	17.23	16.55
	(1.29)	(1.12)	(0.54)	(1.59)	(1.50)	(1.17)	(1.61)	(1.47)
Carbonate	3.83	3.81	3.55	3.68	3.73	3.60	3.58	3.63
	(0.52)	(0.73)	(1.18)	(0.34)	(0.40)	(0.45)	(0.30)	(0.49)
Type I collagen	0.61	0.68	0.96	0.78	0.95*	0.61*	0.84	0.81
	(0.46)	(0.31)	(0.34)	(0.50)	(0.50)	(0.51)	(0.53)	(0.52)
CH₂ bonds	3.12	3.61	3.98	4.45	3.71	3.35	4.57	4.33
	(1.18)	(1.45)	(1.98)	(1.86)	(1.74)	(1.20)	(1.87)	(1.80)

*Asterisks denote statistically significant difference ($P < 0.05$) between before- and after-bleaching areas.

DISCUSSION

Several studies have verified the effectiveness of whitening gels, but determination of tooth color by visual means is highly subjective. General variables, such as external light conditions, clinical experience, and fatigue of human eye, and physiological variables, such as color blindness, lead to inconsistencies in outcomes.²⁵ Instrumental technologies that quantify color and color differences are widely used in dentistry.^{18, 26, 27} Spectrophotometric and colorimetry, applied in both *in vitro* and *in vivo* environments.^{28, 26, 29}

The present study investigated color changes after the enamel-bleaching treatment using a specific experimental reflectance system. The spectra presented distinct reflectance curves that reveal that all groups had been bleached after two treatment sessions.

Our results are in agreement with other studies that revealed changes in enamel reflectance after dental bleaching. Kwon *et al.*¹⁷, Cesar *et al.*¹⁸ and Campos *et al.*¹⁹ evaluated bleaching products with concentrations of 30%, 35% and 37% carbamide peroxide and 35% hydrogen peroxide comparing the reflectance spectra and verified that, after bleaching, the reflectance spectra show that the products effectively bleached the samples.

In the present study, four brands of 35% hydrogen peroxide commercially available were used. All experimental groups were analyzed by photo-reflectance spectroscopy, both before and after the bleaching treatment. The statistical analysis of reflectance showed that there were significant differences after treatment in all groups, and the bleaching agent Whiteform - Perox Red Form gel was more effective than the other products. This is probably due to the pH conditions.³⁰

The pH of bleaching agents is important because it determines the rate of reaction of the bleaching process. The higher the pH, the more free radicals are produced. Price *et al.*³⁰ investigated the pH of some bleaching agents and found that in-office bleaching products were acidic because this results in a longer shelf life. Thus, it would seem that most commercial products are optimized for shelf life rather than optimal bleaching action, but the adverse effects of a low pH tooth-whitening product could be minimized fairly easily (e.g., by adding small amounts of calcium to the product).³⁰

Contemporary approaches and literature has focused on accelerating peroxide bleaching with simultaneous illumination of the anterior teeth with various sources having a range of wavelengths and spectral power, for examples, halogen curing lights, plasma arc lamps, lasers and light-emitting diodes. Case studies have demonstrated the efficacy of light

activated peroxide tooth bleaching systems. However, the literature evidence from in vitro and clinical studies for the actual effect of light on tooth bleaching versus a suitable non-light control is limited and controversial.³¹

Most of the investigators who evaluated the effects of bleaching agents on the surface of tooth hard tissues used hardness tests. These methods require special specimen preparations and examination conditions. Numerous *in vitro* studies have reported that bleaching therapies have a negative effect on physical properties, marginal integrity, enamel and dentin bond strength, and the color of restorative materials. Further, peroxides may cause demineralization in enamel.³²

In the present study, FT-Raman results revealed that dental bleaching by high hydrogen peroxide did not produce significant chemical changes in the inorganic enamel components. Carbonate and phosphate area peaks were not significantly changed after bleaching. In particular, the observation that the CO_3^{2-} ν_1 peak is unaffected by the bleaching action supports the conclusion that high concentration bleaching does not demineralize enamel, as also shown by Gotz *et al.*¹⁰ These results were also supported by the fact that phosphate group concentration within the enamel is a good indicator of the degree of mineralization, and in this case phosphates didn't change after bleaching.¹²

Our results are in agreement with those reported by others.^{9, 10, 24} Using FT-Raman spectroscopy, Park *et al.*⁹ and Wang *et al.*²⁴ found no significant effects on dental enamel treated with 30% and 38% hydrogen peroxide, respectively. Park *et al.*⁹ investigated the effect of prolonged exposure to 30% hydrogen peroxide on bovine enamel. The authors concluded that the use of a 30% hydrogen peroxide solution for dental bleaching is safe due to its negligible effects on tooth morphology and structure. Götz *et al.*¹⁰ found no obvious effects of bleaching with prototype bleaching strips containing hydrogen peroxide gel at 13% and 16% concentrations. They observed a reduction in the background luminescence of spectra after

bleaching by Raman spectroscopy analysis. Wang *et al.*²⁴ have not detected any subsequent enamel alterations caused by a highly concentrated 38% hydrogen peroxide bleaching product (Opalescence Xtra Boost) using Raman spectroscopy.

However, other studies performed with Raman spectroscopy showed significant chemical changes in enamel after bleaching.^{11, 12} Bistey *et al.*¹¹, revealed the effects of 10, 20 and 30% hydrogen peroxide on human enamel by FT-IR spectroscopy, where the $\text{PO}_4 \nu_1$ and $\text{PO}_4 \nu_2$ vibrational modes of phosphate exhibited severe alterations after bleaching. They found that higher concentrations and longer treatment times resulted in more severe alterations. Jiang *et al.*¹² showed that the Raman relative intensity of enamel changed significantly after treatment with 30% hydrogen peroxide.

The severe alterations observed in the Bistey *et al.*¹¹ and Jiang *et al.*¹² studies could probably be due to the fact that the bleaching was performed with a laboratory products (hydrogen peroxide solutions), and the specimens were stored in isotonic salt solution after the bleaching. In contrast to Bistey *et al.*¹¹ study, we used FT-Raman spectrophotometry and had the advantage of avoiding time-consuming sample preparation. In addition, there was no need for specimen inclusion into resin for spectroscopic analysis. Another difference was that our specimens were stored in artificial saliva before and after bleaching, simulating clinical conditions and accounting for the saliva buffering effect.¹⁶ Saliva plays a fundamental role in maintaining the physical-chemical integrity of tooth enamel by modulating remineralization and demineralization. The main factors controlling the stability of enamel hydroxyapatite are the active concentrations of free calcium, phosphate, and fluoride in solution and salivary pH.³³

The organic matrix components were also not significantly affected ($P > 0.05$) by hydrogen peroxide bleaching, except for the group treated with the Whiteform gel (G3) ($P < 0.05$). Bleaching with this gel probably resulted in greater decomposition of the dye

molecules embedded in dental enamel than the other products. Those changes were observed in the present study using the peak centered at 1665 cm^{-1} , which is related to type I collagen from dental organics.²⁴ We suggest that the greater reduction in the organic component results from the strong oxidizing ability of the Whiteform gel because of its acidity, which would allow the hydrogen peroxide to penetrate the enamel boundaries between nanocrystals, where it may then attack organic matter.

These results confirm the applicability of reflectance and FT-Raman analysis to measure color alterations and chemical components in dental structures after bleaching. An advantage of these non-invasive techniques is their multiple applications in dentistry. However more studies *in situ* and *in vivo* are needed to complement the information obtained from this study.

CONCLUSIONS

The clinical significance of the present study was the analysis of the bleaching effects of four commercial hydrogen peroxide gels by reflectance analysis. Under the conditions of this study, 35% hydrogen peroxide Whiteform – Perox Red Form gel, exhibited great bleaching potential. This highly concentrated hydrogen peroxide gel significantly changed the reflectance of enamel and dental organics without significant chemical changes in enamel phosphate and carbonate content.

ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation was supported by FAPESP (grant numbers 2001/14384-8 and 1996/5590-3) and CNPq (grant number 302393/2003-0). The authors gratefully acknowledge the technical assistance of Dr. Gustavo de Luca Alves for help in this study.

REFERENCES

1. Haywood, V.B. (2000). Current status of nightguard vital bleaching. *Compend Cont Educ Dent*; 28:S10 –7, S48.
2. Amato, M.; Serena Scaravilli, M.; Farella, M. and Riccitiello, F. (2006). Bleaching teeth treated endodontically: long-term evaluation of a case series. *J Endod*; 32:376–8.
3. Camargo, S. E. A.; Valera, M. C.; Camargo, C.H. R.; Mancini, M. N. G. and Menezes, M. M. (2007). Penetration of 38% Hydrogen Peroxide into the Pulp Chamber in Bovine and Human Teeth Submitted to Office Bleach Technique. *J Endod*. 33:1074–1077.
4. Haywood VB, Heymann HO. (1989). Nightguard vital bleaching. *Quintessence Int*. 20(3):173-176.
5. Lee, B.S.; Huang, S.H.; Chiang, Y.C.; Chien, Y.S., Mou, C.Y. and Lin, C.P. (2008). Development of in vitro tooth staining model and usage of catalysts to elevate the effectiveness of tooth bleaching. *Dent Mater*. 24(1):57-66.
6. Buchalla, W. and Attin, T. (2007). External Bleaching Therapy with activation by heat, light or laser – A systematic review. *Dent Mater*. 23, 586-96
7. Brook, A.H.; Smith, R.N. and Lath, D.J. (2007). The clinical measurement of tooth colour and stain. *Int Dent J*. 57(5):324-30.
8. Karamouzos, A.; Papadopoulos, M.A., Kolokithas, G. and Athanasiou, A.E. (2007) Precision of in vivo spectrophotometric colour evaluation of natural teeth. *J Oral Rehabil*. 34(8):613-21.

9. Park, H.J., Kwon, T.Y., Nam, S.H., Kim, H.J., Kim, K.H. and Kim, Y.J. (2004). Changes in Bovine Enamel after treatment with a 30% Hydrogen Peroxide Bleaching Agent. *Dent Mat J.* 23, 517-521.
10. Götz, H., Duschner, H., White, D.J. and Klukowska, M. (2007). Effects of elevated hydrogen peroxide strip bleaching on surface and subsurface enamel including subsurface histomorphology, micro-chemical composition and fluorescence changes. *J Dent.* 35, 457-466.
11. Bistey, T., Nagy, I.P., Simó, A. and Hegedus, C. (2007). In vitro FT-IR study of the effects of hydrogen peroxide on superficial tooth enamel. *J Dent.* 35, 325-330.
12. Jiang, T., Ma, X., Wang, Y., Tong, H., Shen, X., Hu, Y. and Hu, J. (2008). Investigation of the effects of 30% hydrogen peroxide on human tooth enamel by Raman scattering and laser-induced fluorescence. *J Biomed Optic.* 13, 014019.
13. Gilchrist, F., Santini, A., Harley, K. and Deery, C. (2007). The use of micro-Raman spectroscopy to differentiate between sound and eroded primary enamel. *Int J Paed Dent.* 17, 274-280.
14. Soares, L.E.S., Resende, E.B.P.S., Brugnera, A., Zanin, F.A.A. and Martin, A.A. (2007). Combined FT-Raman and SEM studies of the effects of Er : YAG laser irradiation on dentin. *Photomed. Laser Surg.* 25, 239-244.
15. Hara, A.T., Queiroz, C.S., Giannini, M., Cury, J.A. and Serra, M.C. (2004). Influence of the mineral content and morphological pattern of the artificial root caries lesion on composite resin bond strength. *Eur J Oral Sci.* 11, 67-72.
16. Hara, A.T., Karlinsey, R.L. and Zero, D.T. (2008). Dentine remineralization by simulated saliva formulations with different Ca and Pi contents. *Caries Res.* 42, 51-56.
17. Kwon, Y.H., Huo, M.S., Kim, K.H., Kim, S.K. and Kim, Y.J. (2002). Effects of hydrogen peroxide on the light reflectance and morphology of bovine enamel. *J. Oral Rehabil.* 29, 473-477.

18. Cesar, I.C.R., Redigolo, M.L., Liporoni, P.C.S. and Munin, E. (2005). Analyses by photoreflectance spectroscopy and Vickers hardness of conventional and laser-assisted tooth bleaching. *Am J Dent.* 18, 219-222.
19. Campos, S.F.F., Cesar, I.C.R., Munin, E., Liporoni, P.C.S. and Rego, M.A. (2007). Analysis of Photoreflectance and microhardness of the enamel primary teeth submitted to different bleaching agents. *J Clin Pediat Dent.* 32, 9-12.
20. Chu, S.J.Q. (2003). Use of Reflectance Spectrophotometer in Evaluating Shade change resulting from Tooth-Whitening Products . *Esthe and Rest Dent.* 15, 542-548.
21. Soares, L.E.S., Cesar, I.C.R., Santos, C.G.C., et al. (2007). Influence of coffee on color and chemistry of composite resin protected by surface sealant. *Am J Dent.* 20, 299-304.
22. Borges, A.F.S., Bitar, R.A., Kantovitz, K.R., Correr, A.B., Martin, A.A. and Puppini-Rontani, R.M. (2007). New perspectives about molecular arrangement of primary and permanent dentin. *Appl Surf Sci.* 254, 1498-1505.
23. Tsuda, H., Ruben, J. and Arends, J. (1996). Raman spectra of human dentin mineral. *Eur J Oral Sci.* 104, 123-31.
24. Wang, X., Mihailova, B., Klocke, A., Fittschen, U.E., et al. (2008). Side effects of a non-peroxide-based home bleaching agent on dental enamel. *J Biom Mater Res. Part A* 19, Epub ahead of print.
25. Paul, S., Peter, A., Pietobon, N. and Hammerle, C.H.F. (2002). Visual and Spectrophotometric shade analysis of human teeth. *J Dent Res.* 81, 578-582.
26. Lee, Y.K., Lu, H. and Powers, J.M. (2005). Effect of surface sealant and staining on the fluorescence of resin composites. *J Prosthet Dent.* 93, 260-266.
27. Choi, M.S., Lee, Y.K., Lim, B.S., Rhee, S.H. and Yang, H.C. (2005). Changes in surface characteristics of dental resin composites after polishing. *J Mater Sci: Mater Med.* 16, 347–353.

28. Kolbek, C., Rosentritt, M., Lang, R. and Handel, G. (2006). Discoloration of facing restorative composites by UV-irradiation and staining food. *Dent Mat.* 22, 63-68.
29. Buchalla, W., Attin, T., Hilgers, R.D. and Hellwig, E. (2002). The effect of water storage and light exposure on the color and translucency of a hybrid and a microfilled composite. *J Prosthet Dent.* 87, 264-270.
30. Price, R.B.T., Sedarous, M., Hiltz, G.S. (2000). The pH of Tooth-Whitening Products. *J Can Dent Assoc.* 66, 421-426
31. Joiner A. (2006). The bleaching of teeth: A review of the literature. *J Dent.* 34(7):412-419.
32. Medeiros, C.L.S.G., González-López, S., Bolaños-Carmona, M.V., Sanchez-Sanchez, P. and Bolaños-Carmona, J. (2008). Effects of phosphoric acid on bovine enamel bleached with carbamide peroxide. *Eur J Oral Sci.* 116, 66–71.
33. De Almeida, P.D.V., Grégio, A.M.T., Machado, M.Â.N., de Lima, A.A.S. and Azevedo, L.R. (2008). Saliva Composition and Functions: A Comprehensive Review. *J Contemp Dent Pract.* (9)3, 072-080

*Corresponding author: Dr. Ilene Cristine Rosia Cesar, Laboratory of Biomedical and Non-Linear Optics, Research and Development Institute IP&D, Vale do Paraíba University, UNIVAP, São José dos Campos, São Paulo, Brazil. Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, 12.244-000, São José dos Campos, SP, Brazil, Phone/fax: +55-12-3947-1128. E-mail: ilecris@univap.br

3.3 Artigo 3 - *American Journal of Dentistry*, Vol. 20, No. 5, October, 2007

Influence of coffee on reflectance and chemistry of resin composite protected by surface sealant

American Journal of Dentistry, Vol. 20, No. 5, October, 2007

Luís Eduardo Silva Soares, Ilene Cristine Rosia Cesar, Carla Gabriela Couto Santos, Ana Luiza Merigo de Oliveira Cardoso, Priscila Christiane Suzy Liporoni, Egberto Munin, Airton Abrahão Martin.

Influence of coffee on reflectance and chemistry of composite resin protected by surface sealant

Luís Eduardo Silva Soares*, DDS, PhD, Assistant Professor of Dentistry, Department of Dentistry, UNIVAP and Laboratory of Biomedical Vibrational Spectroscopy, Research and Development Institute, Vale do Paraíba University, UNIVAP, São José dos Campos, São Paulo, Brazil

Ilene Cristine Rosia Cesar, DDS, MSc, Assistant Professor of Dentistry, Department of Dentistry, UNIVAP and Laboratory of High Power Lasers, Research and Development Institute, Vale do Paraíba University, UNIVAP, São José dos Campos, São Paulo, Brazil

Carla Gabriela Couto Santos, DDS, Vale do Paraíba University, UNIVAP, São José dos Campos, São Paulo, Brazil

Ana Luiza Merigo de Oliveira Cardoso, DDS, Vale do Paraíba University, UNIVAP, São José dos Campos, São Paulo, Brazil

Priscila Christiane Suzy Liporoni, DDS, PhD, Professor of Dentistry, Department of Dentistry, Vale do Paraíba University, UNIVAP, São José dos Campos, São Paulo, Brazil

Egberto Munin, Phys, PhD, Professor of Physics, Laboratory of High Power Lasers, Research and Development Institute, Vale do Paraíba University, UNIVAP, São José dos Campos, São Paulo, Brazil

Airton Abrahão Martin, Phys, PhD, Professor of Physics, Laboratory of Biomedical Vibrational Spectroscopy, Research and Development Institute, Vale do Paraíba University, UNIVAP, São José dos Campos, São Paulo, Brazil

*Reprint requests to: Dr. Luís Eduardo Silva Soares. Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D, Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP. Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, 12.244-000, São José dos Campos, SP, Brazil, Phone/fax: +55-12-3947-1165 / 3947-1149. E-mail: lesoares@univap.br

Influence of coffee on reflectance and chemistry of composite resin protected by surface sealant

ABSTRACT

Purpose: Assess the influence of the LCU type and whether or not it was worth using surface sealants protection on resin composite restorative materials stained by coffee. The influence of these two factors on the chemistry and reflectance of composite resin were determined by FT-Raman and reflectance spectroscopy, respectively. Another objective was to propose the monitoring of coffee staining by FT-Raman spectroscopy using CH bonds as reference to the composite matrix degradation. **Methods:** Sixty cylindrical specimen of composite resin were prepared and divided into six groups: HC (control) - cured with a halogen light unit; LC (control) cured with a LED unit; HF - cured with a halogen light + Fortify Plus; LF - cured with a LED + Fortify Plus; HP - cured with a halogen light + PermaSeal; LP - cured with a LED + PermaSeal. After storage for 24 hours at 37% and 100% of relative humidity, the top surface was protected, and the other surfaces isolated. Polishing with paper discs was performed after 24 hours of curing and prior to FT-Raman Spectroscopy and reflectance measurements. All specimens were submitted to coffee staining for 14 days and evaluated by both systems. Results were statistically analyzed by ANOVA and Tukey tests. **Results:** FT-Raman spectrum showed significant changes only in groups LC and LP ($p < 0.05$). Reflectance demonstrated that staining was present in all specimens protected by sealants. Sealant staining was larger in the HF ($p < 0.001$) group.

CLINICAL SIGNIFICANCE: Significant chemical changes were observed in the resin matrix when cured with the LED LCU, which produced a larger composite staining than the halogen light. The Fortify Plus sealant stained more than the PermaSeal sealant. There are no

advantages in using surface sealants to prevent composite staining as they stained, thus affecting the aesthetics of restorations.

Introduction

An unacceptable color match is a major reason for the replacement of composite restorations materials.¹⁻⁵ Intrinsic factors due to changes in the filler, matrix or silane coating, or even extrinsic factors such as adsorption or absorption of stains, may cause discoloration of aesthetic materials.⁶ Another reason is the degradation or staining within the superficial layer of the resin composite related to dietary and smoking habits.^{3,5}

The staining capacity of resin composite materials is related to the type of polymerization, filler particles of the composite materials, and type of staining agent.⁷ The degree of degradation and erosion of the polymer matrix is dependent on the chemical composition within the matrix, the cross-linking of the matrix and the degree of conversion.⁸

The structure of the resin matrix and characteristics of the filler particles have a direct impact on the surface smoothness and susceptibility to extrinsic staining. The roughening of the surface caused by wear and chemical degradation can affect gloss and consequently increase extrinsic staining.⁹ It is important to minimize the material's superficial roughness, which is related to its polishability and consequently to the size of its filler particles. The application of surface sealants to resin composite restorations is intended to fill in surface defects, improve marginal integrity and increase resistance to abrasion. Surface sealants may provide better resistance to staining than a polished composite by reducing the porosity of the surface, thus providing a more thoroughly polymerized surface.¹

Optical properties of dental resin composites are influenced by surface changes during restorative procedures of finishing and polishing.⁹ Instrumental technologies that quantify color and color differences are widely used to study color in dentistry.^{1,9} Spectrophotometry and colorimetry, applied to both *in vitro* and *in vivo* environments, have made it possible to

study the numerous parameters related to composite color stability.^{1,2,5-7,10} Studies have been performed using by photoreflectance analysis to observe the dental enamel before and after the bleaching treatment.^{11,12} However, photoreflectance study of composite resin staining has not been performed yet.

An analytic method, such as Raman spectroscopy, provides the direct measurement of the composite resin bonds and is commonly used to determine the degree of conversion (DC) of C=C double bonds of the methacrylate group.¹³⁻¹⁵ However, analytical studies at molecular level to evaluate the chemical influence of beverages on resin composite staining by Raman spectroscopy, have not been performed yet. The effects of surface sealant interaction with a light curing unit (LCU) type on resin composite restorations have not been studied either.

The research hypothesis was that the surface sealant prevents changes in the composite chemistry and reflectance, and that LED curing does not influence these changes. The objectives of this study were to assess the influence of a LCU and whether or not it was worth using surface sealants protection on resin composite restorative materials stained by coffee. The influence of these two factors on the chemistry and reflectance of a composite resin were determined by FT-Raman and reflectance spectroscopy, respectively. Another objective was to propose the monitoring of coffee staining by FT-Raman spectroscopy using CH bonds as reference to the composite matrix degradation.

Materials and Methods

Sample preparations - Sixty samples were prepared with micro-hybrid Filtek Z250 (3M/ESPE Dental Products Division, St. Paul, MN, USA) resin composite. The shade of the tested material was A-3 (Table 1). Samples were divided into six groups according to the light curing unit (LCU) type and type of surface protection: HC – halogen without protection

(control); LC – LED without protection (control); HF – halogen + Fortify Plus sealant; HP – halogen + PermaSeal sealant; LF – LED + Fortify Plus sealant; LP – LED + PermaSeal sealant.

A white Teflon split mold with a cylindrical cavity 7mm in diameter and 2.5-mm thick was used to prepare the specimens. Composite was filled into this mold, covered with a polyester strip (Dentart, Polidental, São Paulo, SP, Brazil; dimensions = 10 x 120 x 0.05mm), and evened with a glass plate. After removing the glass plate, the light tip of the curing unit was adjusted in the center of the resin sample surface with a polyester strip.

Thirty composite samples were cured for 20 seconds with a halogen light LCU (Degulux soft-start / Degussa Hüls AG, Hanau, Germany) at a power density of 745mW/cm² and another thirty samples were cured for 20 seconds with a LED LCU (LD13 / GGDent, Campinas, SP, Brazil) at a power density of 130mW/cm². The emitted power outputs of the LCUs were measured using an optical power meter (model 13PEM001, Melles Griot, Irvine, USA).

Polishing - After the curing process, the specimens were removed from the Teflon mold and stored in distilled water in lightproof containers at 37°C for 24 hours in a culture kiln (FANEM – ORION 502, São Paulo, SP, Brazil). Each lightproof container was named and numbered so that data could be compared before and after staining. After that, the specimens were protected with a double-faced tape on the top and the other faces of the resin composite were isolated with two coats of nail varnish (Colorama, São Paulo, SP, Brazil) and let dry for 24 hours, allowing dye penetration only on the top surface. 48 hours after light-curing, the tape was removed and the top surfaces of the specimens were polished with Sof-Lex paper discs (3M ESPE, 3M do Brasil Ltda., Campinas, SP, Brazil). Two grit discs, medium (dark blue) and thin (light blue) were used. The polishing was performed with a low speed hand

piece for 30 seconds with each grit under constant cooling. (Kavo, Joinville, SC, Brazil). After each polishing step, the specimens were washed with a water spray to remove debris and then dried with a triple syringe. At the end of this procedure, the control group specimens were subjected to FT-Raman and reflectance analysis.

Surface Protection - Surface sealants chemical compositions are listed in Table 1. After the polishing procedure, the specimens of groups HF and LF were protected with filled surface sealant Fortify Plus (Bisco Inc., Schaumburg, IL, USA) according to the manufacturer's instructions: top surface etched with 37% phosphoric acid (FGM, Joinville, SC, Brazil) for 15 seconds; rinsed with water for 30 seconds and air-dried with syringe combination; thin layer sealant application on the top surface; air-thinned by blowing a gentle stream of air over this layer to assure an even distribution and then light-cured for 10 seconds: HF group was cured with a halogen light and LF group was cured with a LED.

The specimens of groups HP and LP were protected with an unfilled methacrylate-based resin PermaSeal (Lot number 62T4; Ultradent Products Inc., South Jordan, Utah, USA) according to the manufacturer's instructions: etched with 37% phosphoric acid at top surface for 15 seconds; rinsed with water for 30 seconds and air-dried with syringe combination; thin layer sealant application on the top surface; air-thinned by blowing a gentle stream of air over this layer to assure an even distribution and light-cured for 20 seconds: HP group was cured with a halogen light and LP group was cured with a LED.

The PermaSeal sealant contains Tertiary amine, Methacrylate monomer and no particles. The specimens were stored for 24 hours at 37°C before FT-Raman and reflectance analysis.

Table 1 Technical specification of Filtek Z250 resin composite, PermaSeal and Fortify Plus sealants.

Material	Resin composite (Filtek Z250)	PermaSeal	Fortify Plus
Batch number	010076	62T4	0300014510
Composition	Bis-GMA, UDMA, Bis-EMA, TEGDMA	Tertiary amine, Methacrylate monomer	UDMA, Ethoxylated Bisphenol A dimethacrylate
Filler type	Zirconia/SiO ₂	Without particles	Amorphous silica
Filler content	60% (volume)	-	Not informed
Shade	A3	-	-
Particle size	0.01-3.5 μm	-	Not informed

Bis-GMA: bisphenol-glycidyl-methacrylate; HEMA: hydroxyethyl methacrylate; UDMA: urethane-dimethacrylate; TEGDMA: triethyleneglycol dimethacrylate.

Staining Procedure – In order to simulate the staining, composite disks were immersed in lightproof containers with coffee for 14 days. The coffee (Pilão, União, São Paulo, SP, Brazil) was prepared with 08 grams of powder and 100ml of water in a coffee machine (Britânia, São José dos Pinhais, PR, Brazil). Each specimen was immersed daily, for 15 minutes, in a black film canister containing coffee. After each staining section, the specimens were washed with distilled water and stored individually in a black film canister containing distilled water in a culture kiln. For the FT-Raman spectroscopy and reflectance tests, the specimens were removed from the kiln, washed with distilled water and air-dried.

FT-Raman spectroscopy analysis - The composite resin's top surface was analyzed by FT-Raman spectroscopy to evaluate changes in the chemistry of composite organic matrix.

Spectra of the samples before and after coffee staining were obtained using an FT-Raman Spectrometer (RFS 100/S – Bruker Inc., Karlsruhe, Germany). To excite the spectra, the defocused 1064.1nm line of a Nd:YAG laser source was used. Laser power was of about 230mW and the system's spectral resolution was of 4cm^{-1} .¹⁵ FT-Raman spectra of the specimens were obtained by using 150 scans. For each sample, one spectrum was collected at one central point of the composite top surface. In order to obtain a good signal to noise ratio, 150 scans were co-added for each spectra. Altogether, 120 spectra were obtained.

The spectra in the region of interest, between 2600 and 3200cm^{-1} , were analyzed using a curve fitting routine by an analytical software (Microcal Software, Inc., Northampton, MA, USA), which allowed the subtraction of background scattering and reduction of noise level by digital filtering. All spectra were processed by fitting the Raman vibrational stretching mode at 2930 and 3070cm^{-1} . To obtain the area of each band, band decomposition was performed by Gaussian shapes. The band at 2930cm^{-1} was used to evaluate the composite organic matrix degradation by coffee staining. Lower relative area of the Raman peaks was associated to chemical changes in the resin matrix.

Reflectance analysis - The composite resin's top surface was analyzed by photoreflectance to evaluate changes in its reflectance. Spectra of the composite samples were obtained before and after the staining procedure. The reflectance system was composed of one spectrophotometer (Oriel Instruments - Model 77702 - Stratford, CT, USA.) and one Teflon integrating sphere, one fiber-coupled halogen light, as a source of white light, delivering 4mW power at the fiber tip (ROI - Ram Optical Instrumentation - model 150 Illuminator - Chicago, IL, USA), two optical fibers with $600\mu\text{m}$ in diameter for excitation and signal collection and one computer for data acquisition.

A sample prepared with a lighter shade (Shade B1) of the same resin composite was used for color reference. The reference spectra from the lighter shade sample were updated before the measurements of each group and every 10 minutes, long-term instrumental drift. With the spectrophotometer settled to work in the reflectance mode, each sample spectrum was automatically compared with the reference spectrum to result in the sample reflectance spectrum.

All spectral measurements were background-corrected. The Microcal Origin software was used for spectral data processing (Microcal Software, Inc., Northampton, MA, USA) and the relative area under the curves was calculated. The area under the curve gives a measure of the amount of light returned from the sample. A larger relative area under the reflectance spectra is associated to a greater reflection of light by the sample. Lower relative area means more staining.

Statistical methods – Statistical analyses were initially performed using the difference between before and after values of the Raman and reflectance relative area results (vertical comparisons). Comparisons were also performed with the before and after values (horizontal comparisons).

Statistical analyses were performed using the one-way ANOVA test at a 95% confidence level. The Tukey-Kramer Multiple Comparisons post-hoc test was also performed (GraphPad Software, San Diego, USA).

Results

FT-Raman spectra results - The FT-Raman spectra of the control group specimens showed a small reduction in the intensity of the peak at 2930cm^{-1} after the staining for both light-curing units (Fig.1). The spectra of the groups cured by the LED and protected with Fortify Plus (LF)

and PermaSeal (LP) showed an increase in the intensity of the peak at 2930cm^{-1} after the staining (Fig. 2). A similar effect was observed in the groups cured with a halogen light (HF and HP) (Fig. 3).

The averages of the relative area of the peak at 2930cm^{-1} related to the C-H bond of CH_3 group before and after the coffee staining are listed in Table 2. Statistical comparisons using the difference between before and after values of the Raman relative area results (Table 2 – vertical comparisons) showed that a significant statistical reduction in the peak area of the LC group ($P < 0.05$) was found after the staining. This significance was not observed ($P > 0.05$) in the HC group. The relative peak area after staining increased significantly in the groups that received the surface protection ($P < 0.001$).

Statistical comparisons considering only the before values of the Raman relative peak area (Table 2 – horizontal comparisons, row 1) showed that there were no significant statistical differences among the control groups and the groups with the surface sealant. The control groups were statistically different from the sealant groups in the relative peak area.

Statistical comparisons considering only the after values of the Raman relative peak area (Table 2 – horizontal comparisons, row 2) showed that the LP area was greater than the LC and HF areas ($P < 0.05$). The other comparisons showed a non-significant difference in the before values of the relative peak area (LF vs. HF; LP vs. HP; LF vs. LP; HF vs. HP) ($P > 0.05$).

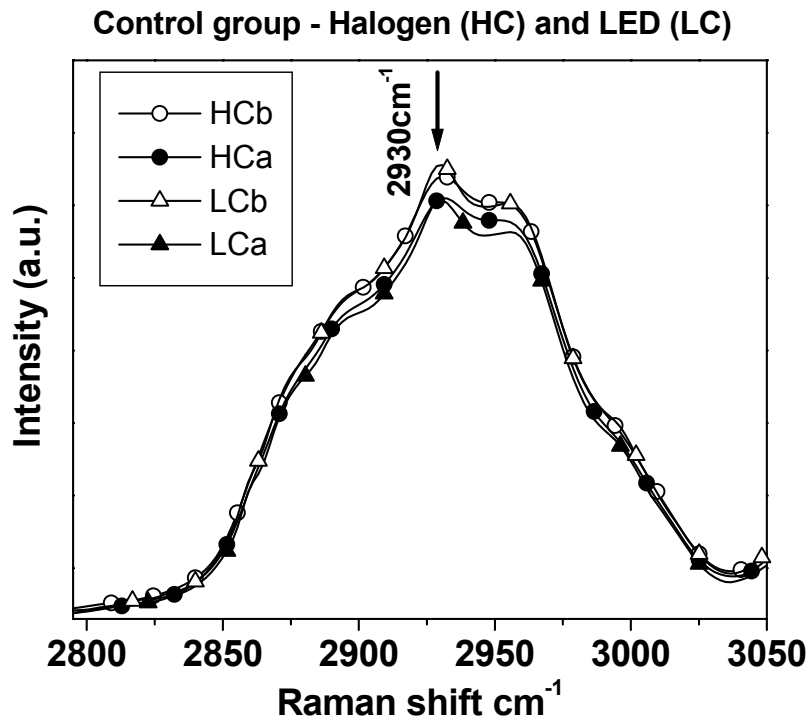


Fig. 1. A typical measured FT-Raman spectra for composite specimens cured with halogen light (HC) and with LED (LC) before (b) and after (a) staining. The higher spectra intensity corresponds to the Raman spectrum before the composite staining (white symbol). The lower spectra intensity corresponds to the Raman spectrum after composite staining (black symbol). The arrow indicates a decrease in the relative intensity of the peak at 2930cm^{-1} related to C-H bonds of resin.

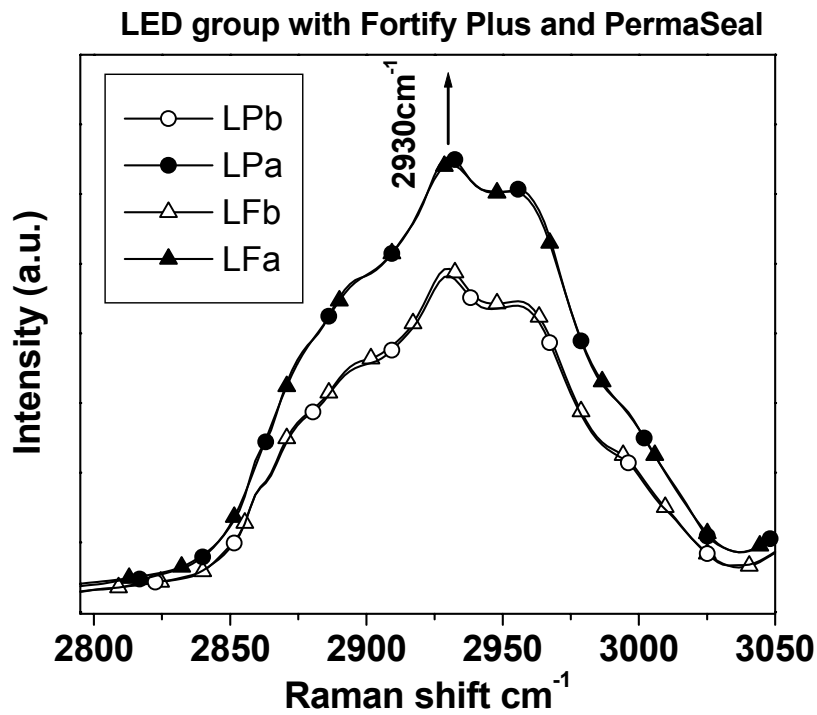


Fig. 2. A typical measured FT-Raman spectra for composite specimens cured with LED and protected by PermaSeal (LP) or Fortify Plus (LF) before (b) and after (a) staining. The higher spectra intensity corresponds to the Raman spectrum after composite staining (black symbol). The lower spectra intensity corresponds to the Raman spectrum before composite staining (white symbol). The arrow indicates an increase in the relative intensity of the peak at 2930cm^{-1} related to C-H bonds of resin.

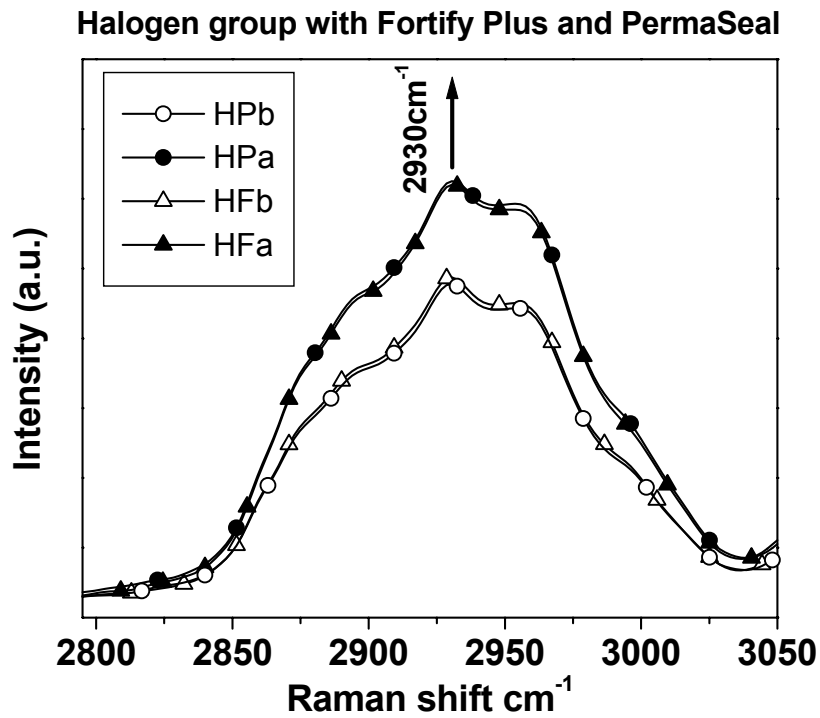


Fig. 3. A typical measured FT-Raman spectra for composite specimens cured with halogen light and protected by PermaSeal (HP) or Fortify Plus (HF) before (b) and after (a) staining. The higher spectra intensity corresponds to the Raman spectrum after composite staining (black symbol). The lower spectra intensity corresponds to the Raman spectrum before composite staining (white symbol). The arrow indicates an increase in the relative intensity of the peak at 2930cm^{-1} related to C-H bonds of resin.

Table 2 Mean values and standard deviations (SD) of the relative area (arbitrary units) of the peak at 2930 cm^{-1} related to the C-H bonds obtained by FT-Raman spectroscopy before (B) and after (A) coffee staining.

	HC	LC	HF	LF	HP	LP
B	7.94 (0.4) ^{A*}	7.93 (0.2) ^A	5.98 (0.4) ^B	6.01 (0.2) ^B	5.96 (0.2) _B	5.83 (0.2) ^B
A	7.54 (0.2) [*]	7.39 (0.3) ^A	7.37 (0.5) ^A	7.88 (0.5)	7.56 (0.3)	7.92 (0.2) ^C

Tukey test showed that means followed by different superscript letters in the row differ among them ($P < 0.05$). Asterisk denotes no significant difference ($P > 0.05$) between before and after areas.

Reflectance spectra results - It could be observed that the sample's reflectance is more sensitive to staining on the blue-side of the spectral curve. After staining, reflectance values in the blue region were reduced to about 80% in the HC group and to under 80% in the LC group (Fig. 4). For the experimental groups that received sealants, after staining, reflectance in the blue region was reduced to about 60% in both the LF and LP groups (Figs. 5, 6). After staining, reflectance in the HF and HP groups was reduced to under 60% and to about 70%, respectively (Figs. 5, 6).

The averages of the relative area under the reflectance curves before and after the coffee staining are listed in Table 3. Statistical comparisons using the difference of before and after values of the reflectance relative area under the curve (Table 3 – vertical comparisons) showed that after 14 days all tested groups stained with statistical significance.

Statistical comparisons considering only the before values of the reflectance relative area results (Table 3 – horizontal comparisons, row 1) showed that there were no significant

statistical differences between the control groups and the groups protected with the surface sealant in the before areas.

Statistical comparisons considering only the after values of the reflectance relative area results (Table 3 – horizontal comparisons, row 2) showed no statistical difference among the control group specimens (HC vs. LC – $P>0.05$). The comparisons between the control groups and the groups protected with the surface sealant showed significant differences ($P<0.001$). The comparison of the area under the curve for the groups that received the same surface sealant but were cured with different LCUs (LF vs. HF and LP vs. HP) showed no statistical difference among the LCUs ($P>0.05$). When comparing of the area under the curve for the groups that were cured with the same LCU but received different surface sealants there was significant statistical difference between groups HF and HP ($P<0.001$). However, this difference was not observed ($P>0.05$) in the LF and LP groups

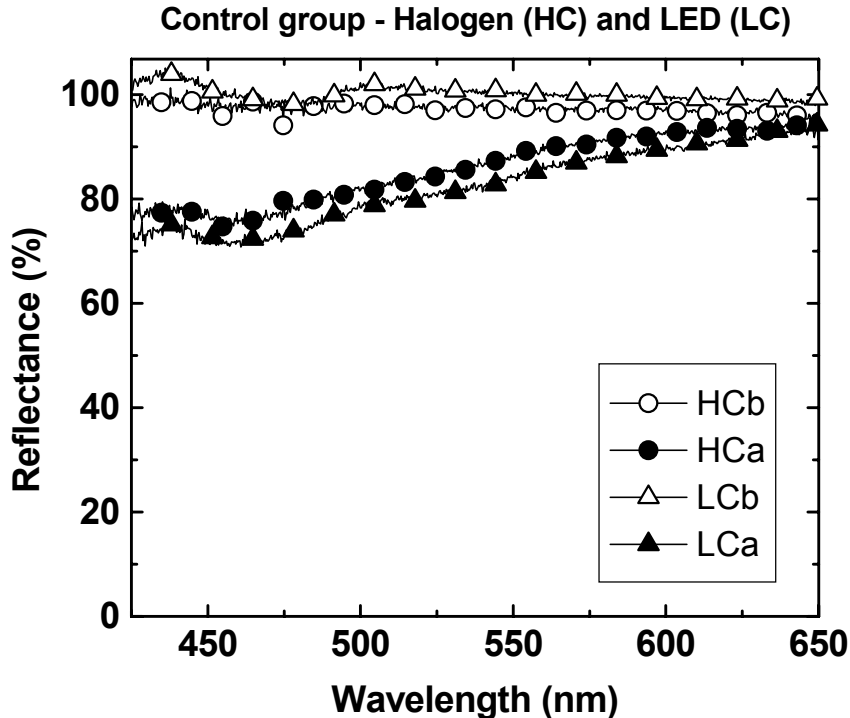


Fig. 4. A typical measured photorefectance spectra for composite specimens cured with halogen light (HC) and LED (LC) before (b) and after (a) staining. The higher reflectance

curves correspond to the photoreflectance spectrum before composite staining (white symbol). The lower reflectance curves correspond to the photoreflectance spectrum after composite staining (black symbol).

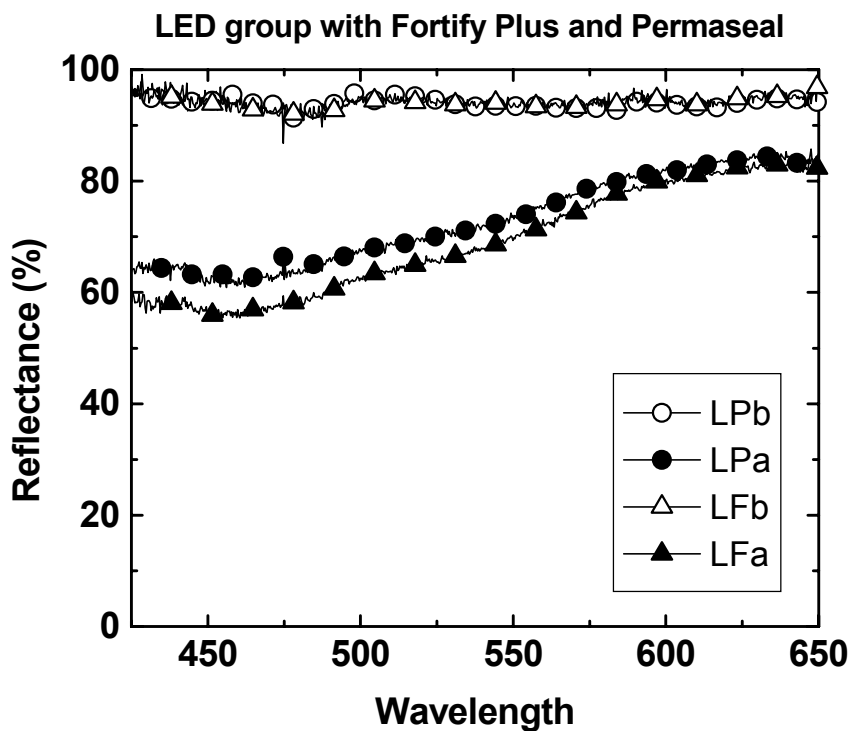


Fig. 5. A typical measured photoreflectance spectra for composite specimens cured with LED (L) and protected by PermaSeal (P) or Fortify Plus sealant (F) before (b) and after (a) staining. The higher reflectance curves correspond to the photoreflectance spectrum before composite staining (white symbol). The lower reflectance curves correspond to the photoreflectance spectrum after composite staining (black symbol).

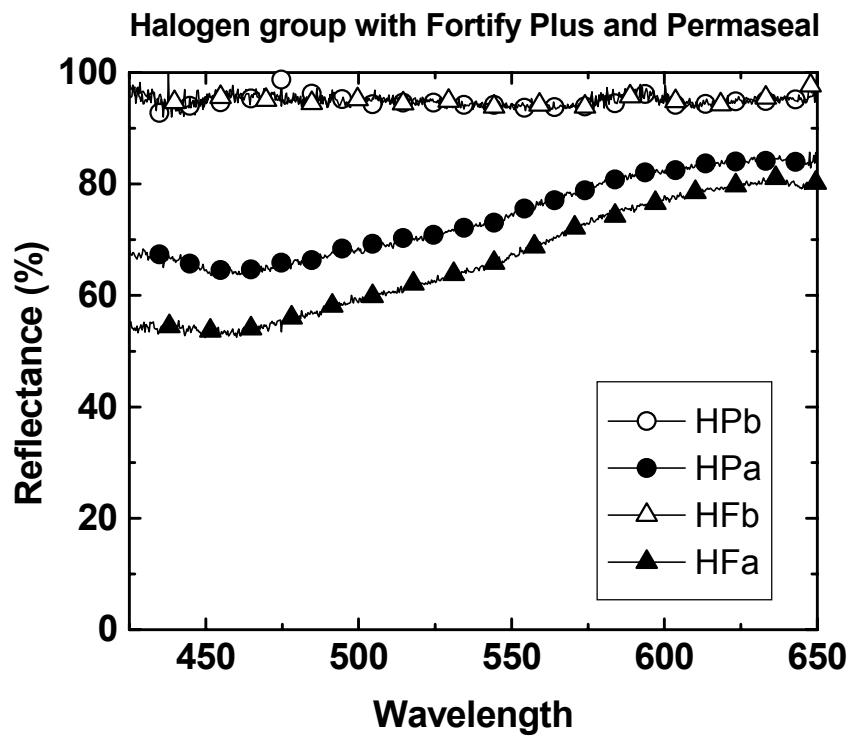


Fig. 6. A typical measured photoreflectance spectra for composite specimens cured with halogen light (H) and protected by PermaSeal (P) or Fortify Plus sealant (F) before (i) and after (f) staining. The higher reflectance curves correspond to the photoreflectance spectrum before composite staining (white symbol). The lower reflectance curves correspond to the photoreflectance spectrum after composite staining (black symbol).

Table 3 Mean values and standard deviations (SD) of the relative area (arbitrary units) of the spectra obtained by reflectance analysis before (B) and after (A) coffee staining.

	HC	LC	HF	LF	HP	LP
B	21958 (170) ^A	22563 (226) ^A	21410 (461) ^A	21208 (515) ^A	21362 (233) ^A	21190 (455) ^A
A	19427 (651) ^A	18564 (958) ^A	15028 (853) ^B	15525 (645) ^{BD}	16644 (874) ^C	16400 (601) ^{CD}

Tukey test showed that means followed by different superscript letters in the row differ among them ($P < 0.05$).

Discussion

To the best of our knowledge, there are no reports about Raman spectroscopy evaluation of chemical changes in composite resin and surface sealants by staining. In this study, we proposed the evaluation of the peak at 2930cm^{-1} by FT-Raman spectroscopy, which is assigned to the C-H bonds of CH_3 group of matrix resin,¹⁶ to monitor the effects of the staining on the composite chemistry. There are no previous studies reporting the monitoring of changes in the Raman peak caused by staining and related to the composite matrix component. Another Raman peak is assigned to the matrix resin. The band at 1454cm^{-1} is assigned to the CH_2 group of both BISGMA and HEMA of composite resin.¹⁷ However, we selected the peak at 2930cm^{-1} , since the Raman signal to noise ratio of this peak is better than the other matrix peak. The relative area of the peak at 2930cm^{-1} was calculated, and the changes in this peak were related to possible changes in the matrix resin. A lower relative area value was related to the chemical modification of the resin.

The difference observed in the intensity of the peak at 2930cm^{-1} was due to the presence or absence of the sealant layer in the resin surface. Control group specimens that did not receive the sealant showed intensity reduction, thus indicating chemical changes due to staining. Sealant group specimens showed lower intensity in the before spectra due to the presence of the sealant layer that changed the optical characteristics of the resin surface. The intensity increased after staining, indicating chemical changes.

A negative influence of the LCU on the organic matrix chemistry was found when the LED cured the composite and the surface sealant was not applied. The LC group showed a more significant lower relative area of the C-H bonds than the control group cured with a halogen LCU (Table 2 – vertical comparison and Fig. 1). In this case, the influence of the LED's low power may be considered when compared to the halogen light power. This low power probably produced a lower degree of conversion and the softening of the organic matrix, resulting in a composite which is more susceptible to staining.^{3,6} The reduction in the relative peak area at 2930cm^{-1} after staining is probably due to changes coffee produced in the organic matrix.

Groups that received a surface sealant application showed smaller before areas than the control groups (Table 2, horizontal comparisons, row 1). This is probably due to the presence of the sealant layer that changed the optical properties of the resin surface and influenced in the before area values. After the staining, the peak area increased, probably indicating that the resin matrix chemistry was changed. Considering the comparisons between the sealants and the control groups (Table 2, horizontal comparisons, row 2), the LP group showed statistically significant higher relative area values than the LC and HF groups. This difference could demonstrate that the resin covered with the PermaSeal sealant presented fewer changes in the matrix than in the control specimens and Fortify Plus treated specimens. This fact is probably due to the absence of the filler particles in the PermaSeal sealant and to

the differences in the sealant composition, which resulted in a higher level of coffee absorption as well as higher scattering of Raman laser irradiation than in the LC and HF specimens.

Color stability is critical to the long-term aesthetics of restorations and has been previously studied *in vitro* with a variety of restorative materials using different techniques.^{5-7,9,18} Optical properties of dental resin composites are influenced by surface changes during restorative procedures of finishing and polishing.⁷

The present study investigated composites' reflectance changes after the coffee staining by one experimental reflectance system. The spectra presented distinct reflectance curves before and after the staining and this fact reveals that all groups stained after 14 days. The reflectance spectra demonstrated that changes in the surface reflectance occurred in all tested groups (Figs. 4-6). The composite specimens that received the surface sealant application darkened more than the control group specimens (Fig. 4). The sealant layer probably absorbed the coffee and prevented it from penetrating into the resin matrix.

The type of LCU (LED versus Halogen) did not influence significantly in the sealants' color ($P>0.05$) (Table 3). When the composite was protected by the Fortify Plus sealant and cured with the halogen light and LED LCUs, the surface sealant color was more affected than with the PermaSeal ($P<0.001$) (Figs. 5 and 6). An attempt to explain these findings is that the Fortify Plus composition probably had an influence over this difference in the staining, since the monomer chemistry, the molecular weight and the polymer macromolecular structure affect its properties. Another aspect is the thickness of the sealant on the composite surface. The Fortify Plus sealant contains amorphous silica and this could produce a thicker layer that is more susceptible to staining. Light activation time could also influence the change in color. The curing time was of 10 seconds for the Fortify Plus sealant and of 20 seconds for the

PermaSeal. The difference in the sealants' curing time could influence the susceptibility to stain.

Staining of resin composites might be attributed to their degree of water sorption and hydrophilicity of the matrix resin. If the resin composite can absorb water, then it is also able to absorb other fluids, which result in its discoloration. Water sorption occurs mainly as direct absorption by the resin matrix. The glass filler particles will not absorb water in the bulk of the material, but can adsorb water on the surface. Thus, the amount of water sorption depends on the resin content, resin composite and quality of the bond between resin and filler. Extra water sorption may decrease resin composites life span by expanding and plasticizing the resin component, hydrolyzing the silane and causing microcrack formation. Therefore, the micro-cracks or the interfacial gaps in the interface between filler and matrix allow stain penetration and discoloration.¹⁸ We verified that the presence of the surface sealant created a blocking effect to staining, providing better protection to the resin than in the smoother surface of control groups.

The reflectance results complemented the chemical information obtained by FT-Raman. The control group specimens stained after 14 days, but in the specimens cured with the halogen LCU the chemistry of the organic matrix was not significantly affected, showing that polymerization influenced the staining. This result is in agreement with Satou *et al*¹⁹ who reported that physicochemical properties of monomers in the resin matrices influence the adsorption of staining food. The unconsumed initiators or monomers might have hydrophilized groups to uptake the hydrophil coloring molecules of the coffee in the LED-cured specimens.

The reflectance spectra showed that the composite specimens of the control group stained more than the specimens that received application of surface sealants. The presence of

the surface sealant prevented coffee from penetrating into the resin composite organic matrix. The surface sealant stained and probably avoided the composite from staining.

FT-Raman spectroscopy provided information about composite staining at molecular level, showing changes in the C-H bonds when the LED cured the composite. This aspect is probably due to the low power of the LED. Specimens of the LP group showed significant changes in the chemistry and the color of the composite-sealant system. Specimens of the HF group showed significant changes in the color of the sealant and the relative area of the C-H bonds increased less than in the LP group, showing absorption of coffee by the PermaSeal sealant.

Reflectance analysis evaluated the surface color of the composite, showing that staining was greater in the groups that received surface sealants. This is in agreement with Kolbeck *et al*⁵ who reported that the composition of the composite matrix in combination with the quality of the polymerization reaction, method of light activation and curing time is the main responsible for the color stability of restorative materials.

Raman and reflectance results showed that composite staining was probably blocked in the group of specimens protected by sealants. Therefore, a surface polishing could probably remove this superficial staining. The composite matrix was chemically changed in the composite samples cured by the LED and not protected by sealants as showed by the Raman spectra. The results obtained in the present study have clinical relevance and provide clinicians with information about surface sealants. There are no advantages in recommending the use of sealants to prevent composite resins from staining because the aesthetics is compromised anyway Sealant manufacturers do not indicate using sealants to prevent staining. Their application must be carefully analyzed when indicated to improve composite wear resistance and to seal composite restorations margins as mentioned by the manufacturer. Another consideration is that patients with inadequate hygiene and habits such as smoking,

ingestion of alcohol and coloring substances should not be eligible to receive application of surface sealants due to these unfavorable conditions. The type of LCU influenced staining. Furthermore, both analytical tools were shown to be effective in evaluating chemical and reflectance changes in the composites stained by coffee, at structural and surface level, thus could be used as alternative techniques to standard methods currently used.

Acknowledgements: This investigation was supported by FAPESP (Grants number. 2001/14384-8 and 1996/5590-3) and CNPq (Grant number 302393/2003-0). The authors gratefully acknowledge the technical assistance of Mr. Leandro Procópio Alves and thank the companies Bisco and Ultradent for donating the sealants used in this study.

References

1. Lee YK, Lu H and Powers JM. Effect of surface sealant and staining on the fluorescence of resin composites. *J Prosthet Dent* 2005; 93: 260-266.
2. Buchalla W, Attin T, Hilgers RD and Hellwig E. The effect of water storage and light exposure on the color and translucency of a hybrid and a microfilled composite. *J Prosthet Dent* 2002; 87: 264-270.
3. Schulze KA, Marshall SJ, Gansky SA and Marshall GW. Color stability and hardness in dental composites after accelerated aging. *Dent Mater* 2003; 19: 612-619.
4. Vichi A, Ferrari M and Davidson CL. Color and opacity variations in three different resin-based composite products after water aging. *Dent Mater* 2004; 20: 530–534.

5. Kolbek C, Rosentritt M, Lang R and Handel G. Discoloration of facing restorative composites by UV-irradiation and staining food. *Dent Mater* 2006; 22: 63-68.
6. Reis AF, Gianini M, Lovadino JR and Ambrosano GM. Effects of various finishing systems on the surface roughness and staining susceptibility of packable composite resins. *Dent Mater* 2003; 19: 12-18.
7. Guler AU, Yilmaz F, Kulunk T, Guler E and Kurt S. Effects of different drinks on stainability of resin composite provisional restorative materials. *J Prosthet Dent* 2005; 94: 118-124.
8. Ortengren U, Langer S, Goransson A, Lundgren T. Influence of pH and time on organic substance release from a model dental composite: a fluorescence spectrophotometry and gas chromatography/mass spectrometry analysis. *Eur J Oral Sci* 2004; 112: 530–537.
9. Choi MS, Lee YK, Lim BS, Rhee SH and Yang HC. Changes in surface characteristics of dental resin composites after polishing. *J Mater Sci: Mater Med* 2005; 16: 347– 353.
10. Lee YK and Powers JM. Calculation of colour resulting from composite/compomer layering techniques. *J Oral Rehabil* 2004; 31: 1102-1108.
11. Cesar ICR, Redigolo ML, Liporoni PCS and Munin E. Analyses by photoreflectance spectroscopy and Vickers hardness of conventional and laser-assisted tooth bleaching. *Am J Dent* 2005; 18: 219-222.

12. Kwon, YH, Huo, MS, Kim, KH, Kim, SK, Kim, YJ. Effects of hydrogen peroxide on the light reflectance and morphology of bovine enamel. *J Oral Rehabil* 2002; 29: 473-477.
13. Soares LES, Martin AA and Pinheiro ALB. Degree of conversion of composite resin: A Raman study. *J Clin Laser Med Surg* 2003; 21: 357-362.
14. Soares LES, Martin AA, Pinheiro ALB and Pacheco MTT. Vicker's hardness and Raman spectroscopy evaluation of a dental composite cured by an Argon laser and a halogen lamp. *J Biomed Opt* 2004; 9: 601-608.
15. Soares LES, Rocha R, Martin AA and Zampieri M. Monomer conversion of composite dental resins photoactivated by a halogen lamp and a LED: a FT-Raman spectroscopy study. *Quim Nova* 2005; 28: 229-232.
16. Xu J, Butler IS, Gibson DFR and Stangel I. High-pressure infrared and FT-Raman investigation of a dental composite. *Biomater* 1997; 18: 1653-1657.
17. Wang Y, Spencer P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res* 2003; 82: 141-145.
18. Bagheri R, Burrow MF, Tyas M. Influence of food-simulating solutions and surface finish on susceptibility to staining of aesthetic restorative materials. *J Dent* 2005; 33: 389-398.
19. Satou N, Khan AM, Matsumae I, Satou J and Shintani H. In vitro color change of composite-based resin. *Dent Mater* 1989; 5:384-387.

4 DISCUSSÃO

Preservar a estética ou tornar-se belo já é interesse das pessoas desde o início das civilizações. Assim sendo, a beleza deixou de ser apenas vaidade tornando-se também necessidade, uma vez que a competitividade da sociedade moderna impõe parâmetros considerados ideais, com relação à aparência. Dentes claros são sinônimos de *status* social e sucesso. Essa preocupação com aparência jovem e dentro dos padrões de beleza tem sido uma constante para a grande maioria dos pacientes. Isto torna os procedimentos clareadores um dos maiores desafios dentro da reabilitação estética (PIMENTA; PIMENTA, 1998; CHRISTENSEN, 1978).

Com isso o objetivo da estética não se resume apenas na restauração da forma e função dos elementos dentários, mas na capacidade de restabelecimento de um novo sorriso que se adapte ao estilo de vida do paciente, e também realce suas características estéticas positivas. (MONDELLI, 2003). A cor dos elementos dentários é um fator de extrema importância no restabelecimento da estética dental, as alterações são facilmente percebidas e geram enorme insatisfação na maioria dos pacientes.

A escolha do agente clareador, assim como sua concentração, é requisito importante para o sucesso do tratamento. O peróxido de hidrogênio a 35% é um dos mais utilizados, removendo manchas associadas a fluorose, tetraciclina e trauma (McEVOY, 1989). A reação do peróxido de hidrogênio baseia-se na liberação de óxidos que irão penetrar nos túbulos dentinários e no esmalte, propiciando o clareamento dentário (BARATIERI *et al.*, 1994). O peróxido de hidrogênio atua sobre os pigmentos presentes no esmalte e na dentina, transformando substâncias complexas, compostas de anéis de carbono, em substâncias mais simples (mais claras).

A técnica de aplicação do peróxido de hidrogênio sofreu algumas modificações com o passar dos anos, e alguns agentes clareadores utilizavam-se de lâmpadas, calor, luz ou laser para potencializar seu efeito, com resultados mais rápidos, porém com a mesma eficiência (MIRANDA; REIS; MIRANDA, 2002). Nesses estudos, optamos pela técnica da aplicação do peróxido fotoassistidos por luz halógena, LED.e laser.

Os lasers produzem comprimentos de ondas definidos, podendo atingir moléculas pigmentadas enquanto permanecem relativamente inofensivos à polpa (SMIGEL, 1996). O clareamento dental com laser de Argônio vem sendo utilizado desde 1996. (REYTO, 1998) O laser de Argônio no processo de clareamento é absorvido por pigmentos escuro presentes na

estrutura dental, tornando-o mais efetivo (REYTO, 1998; JONES, *et.al.* 1999), pois sua maior absorção pelo tecido aumenta sua capacidade de ativação da substância. (GARBER, 1997, REYTO, 1998) O uso de catalisador, que pode ser um pigmento, tais como caroteno e sulfeto de manganês que ajuda a transferir energia para o peróxido (JOINER, 2006)

O clareamento com laser no estudo 1, de acordo com os gráficos obtidos pareceu demonstrar, segundo a análise de fotorreflectância, não haver diferença entre os peróxidos, independente da marca; já para as amostras irradiadas com lâmpada halógena, houve uma diferença, sendo que o peróxido de carbamida 37 % pareceu não ter um clareamento com a mesma efetividade que o peróxido de carbamida 35 %. Isto está de acordo com os trabalhos de Smigel, (1996), Reyto, (1998), Kurachi *et al.*, (1999) e Powell *et al.*, (1999), que concluíram que o clareamento a laser é efetivo e não gera grandes aquecimentos. Jones et al (1999) relatou em seu estudo que o peróxido de carbamida, resultou em grande mudança de cor com clareamento a laser em uma única aplicação no consultório. Garber (1997), no entanto, afirmou, que a combinação das duas técnicas, tradicional e com laser, proporciona melhores resultados, promovendo uma maior efetividade e rapidez no tratamento do clareamento dental.

Os aparelhos de LED são uma alternativa para a técnica de clareamento dental em consultório (ANDRADE *et. al.*, 2001). As vantagens deste aparelho são: possuir um baixo custo e não promover um grande aquecimento da estrutura dental.

O LED utilizado no trabalho 2, foi o Sistema Led/ Laser Brightness – Kondortech, sendo efetivo para promover a ativação do agente clareador, havendo diferenças estatisticamente significantes entre elas, quando analisadas pelo sistema de fotorreflectância.

Nesse estudo foram utilizados dentes bovinos devido sua facilidade de obtenção, possibilidade de padronização, e facilidade no armazenamento (SPYRIDES *et al.*,1999; RAMOS; ATTIN *et al.*, 2003; MENEZES *et al.*, 2003; KWON *et al.*, 2002). Além disso, esses dentes apresentam características semelhantes ao esmalte humano principalmente em estudos de erosão, os trabalhos que utilizaram dentes bovinos conseguiram obter condições e resultados cientificamente compatíveis (FUSHIDA; CURY, 1999). Durante os experimentos pode-se observar que dentes bovinos apresentam coloração mais clara que dentes humanos, no entanto essa característica não tem nenhuma influência negativa nesse estudo. Visto que as medidas de cor foram quantificadas.

Muitos estudos demonstraram a eficácia da luz no clareamento dental, porém, a literatura mostra evidências de estudos clínicos *in vitro*, nos quais os efeitos da luz sobre clareamento dental são limitados e controversos. Um estudo *in vitro*, utilizando dentes

humanos naturalmente escurecidos, mostrou que a aplicação de diversas fontes de luz melhorou significativamente a eficácia de alguns materiais clareadores, e de outros não. (JOINER, 2006)

A cor que observamos nos dentes é o resultado da combinação da luz refletida da superfície do esmalte e da luz retroespalhada na interface esmalte/dentina (KWON *et. al.*, 2002). Um dente escuro absorve maior quantidade de luz, provocada pela presença de cadeias moleculares longas e complexas no interior da estrutura dental. Sendo assim, um dente normal tem uma menor absorção e uma maior reflexão da luz, mostrando uma superfície mais clara. A remoção dos pigmentos da estrutura dental promove uma reflexão diferente, mais clara. A luz refletida da superfície é captada por um espectrômetro e é quantificada. Vários autores têm utilizado o sistema de coordenadas de cores (CIE L*a*b*) para quantificar tanto a cor dos dentes quanto o clareamento (HAYWOOD; HOUCK; HEYMANN, 1991; MELNIK, RAWICZ; DETZ, 1998; MOKHLIS *et. al.*, 2000), mas poucos utilizam a fotorrefletância para quantificar o clareamento dental (FRIED *et. al.*, 1997; KWON *et. al.*, 2002; SOARES, 2004; CESAR *et. al.*, 2005). Nesses estudos foi utilizada a fotorrefletância para avaliar a efetividade do clareamento dental e manchamento em materiais estéticos. Para análise dos dados, foi usado o programa *Microcal Origin6.0™* observando o formato da curva espectral e a área dessa curva. (KWON *et. al.*, 2002; SOARES *et. al.*, 2004; SOARES *et. al.*, 2007, CESAR *et. al.*, 2005;).

Kwon *et. al.*, (2002) encontraram, após o clareamento com peróxido de hidrogênio a 30%, um aumento na refletância do esmalte bovino. Cesar *et. al.* (2005) pôde observar através da fotorrefletância que não houve diferenças entre as amostras clareadas com peróxido de carbamida a 35% e 37%, irradiadas com laser de Argônio. Já nas amostras que foram irradiadas com lâmpada halógena, o peróxido de carbamida a 35% mostrou-se ser mais efetivo do que o de concentração de 37%. Carvalho, Robazza e Lage-Marques (2002) verificaram que os resultados obtidos pela espectrofotometria não apresentaram diferenças estatísticas significantes na comparação da ativação dos agentes clareadores pelo calor (instrumento aquecido) e pelo laser de Er:YAG.

No estudo 2, foram utilizados quatro marcas de peróxido de hidrogênio 35%, Whiteness HP, Whiteness Maxx, *Opalescence Extra* e Fórmula e Ação, todos com corantes pois de acordo com Brugnera Jr e Zanin (2004), as fontes de ativação como laser, LED's e luzes, estão distribuídas de acordo com sua frequência e comprimento de onda em nanômetros, no espectro eletromagnético. Dessa forma, o ideal é obtermos um pico de

emissão de energia do ativador (laser, LED's) muito próximo ao pico do espectro de absorção do agente iniciador, alcançando, deste modo, um efeito preciso e específico para o clareamento dental. Isto significa que o gel clareador tem que ter juntado com o peróxido de hidrogênio um corante de cor certa para absorver a luz ativadora. Quanto maior a interação da luz com o produto, mais efetiva o processo de clareamento, não sendo necessária fonte ativadora que gere calor.

Todos os grupos deste estudo 2 foram analisados por fotorreflectância, antes e depois do clareamento, sendo os tratamentos realizados no período de 7 e 14 dias. Nos resultados obtidos verificou-se, depois de aplicado o teste estatístico ANOVA ao nível de 5% de variância seguida do teste-t que houve diferença estatística significativa antes e após o clareamento em todos os grupos, sendo que o agente clareador Fórmula e Ação apresentaram maior efetividade quando comparado as outras marcas utilizadas.

No estudo 3 através da técnica de fotorreflectância, foi realizada uma avaliação direta da alteração de cor provocada na resina pelo manchamento com café variando-se a fonte de luz fotoativadora e também a aplicação de agentes de proteção.

Maixner e Susin (2001) citam que as soluções corantes, como o café, por exemplo, degradam a resina por mecanismos diversos, como a penetração na matriz orgânica e degradação do agente silano de união carga-matriz.

Os espectros de reflectância obtidos mostraram que houve um escurecimento após o manchamento, na faixa de 80% no comprimento de onda de 450nm, para as amostras do grupo controle fotoativadas pela lâmpada halógena. Entretanto, este percentual foi de 70% para as amostras do grupo controle fotoativadas pelo LED. Este fato indica uma influência negativa do LED no manchamento.

Com a análise estatística dos dados das áreas relativas das amostras entre os grupos controle e que receberam a aplicação dos selantes antes e após o manchamento, houve uma alteração extremamente significativa estatisticamente (***) $P < 0,001$ para todas as amostras, indicando que o manchamento esteve presente em todas as amostras.

Entre as marcas comerciais, após o manchamento, foram encontradas diferenças estatísticas extremamente significantes (***) $P < 0,001$ para as amostras fotoativadas pela luz halógena que receberam a aplicação do selante Fortify[®] quando comparado com o selante PermaSeal[®], indicando um maior manchamento para o selante Fortify[®]. As amostras fotoativadas pelo LED não apresentaram diferenças (ns $P > 0,05$) no manchamento com relação à marca comercial.

Quando comparadas às amostras com o mesmo selante e variando-se a fonte de fotoativação também não foram encontradas diferenças estatísticas significantes

Através deste estudo, juntamente com outros estudos realizados por Kwon *et al.*, (2002); Soares *et al.*, (2007) e Cesar *et al.*, (2005) verificaram que a análise de fotorreflectância é um método efetivo para se medir alterações de cor na estrutura dental após a técnica de clareamento, sendo realizados cada vez mais estudos, utilizando este método de avaliação de cor, tanto para clareamento quanto materiais, tais como resinas e porcelanas.

Isso demonstra que essa análise é segura e precisa, além de ser não invasiva e que pode ser utilizada para verificação de cor para vários procedimentos na odontologia estética.

As alterações de cor não são as únicas resultantes do clareamento dental. Muitos estudos comprovam e conseguem demonstrar a existência de modificações estruturais no esmalte dental; seja na sua dureza, na rugosidade da superfície ou em sua composição química (ROTSTEIN *et al.*, 1996; CREWS *et al.*, 1997; HAYWOOD *et al.*, 2001; HOSOYA *et al.*, 2003).

Algumas análises como Microdureza, EDS, EDX, FT-Raman, são capazes de quantificar componentes minerais com objetivo de verificar ganhos ou perdas minerais provenientes da utilização de substâncias ácidas existentes em algumas frutas, refrigerantes e também, quando utilizada a técnica de clareamento dental onde o agente é um peróxido com alto poder de penetração devido ao seu baixo pH (KAWAMOTO; TSUJIMOTO, 2004).

A aplicação de técnicas de microanálise para o estudo das propriedades do esmalte e dentina se torna uma ferramenta importante. Analisar a eficiência das técnicas clareadoras utilizadas atualmente é importante, mas saber se estas técnicas causam danos na estrutura dental é fundamental, pois não adianta clarear os dentes e torná-los enfraquecidos. Com a finalidade de analisar a resistência do esmalte após o clareamento, muitos autores têm utilizado testes de microdureza. (SHANNON *et al.*, 1993; PINHEIRO JR *et al.*, 1996; ATTIN *et al.*, 1997; CIMILLI; PAMEIJER, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2001; WHITE *et al.*, 2002; WHITE *et al.*, 2003)

Alterações no conteúdo mineral das camadas superficiais de esmalte estão diretamente relacionadas às alterações na microdureza (ROTSTIEN *et al.*, 1996; ATTIN *et al.*, 1997) Estudos mostram que há uma diminuição estatisticamente significativa na microdureza do esmalte na medida em que se afasta da superfície externa. (MEREDITH *et al.*; 1996)

Neste estudo 1 foi utilizado a dureza Vickers com uma carga de 50 gramas, em todas as amostras de cada grupo, e lidas 4 indentações na superfície do esmalte, sendo feitas uma média entre elas, utilizada para análise estatística do Desvio Quadrático Médio, verificando

não haver diferença significativa entre os grupos. Pinheiro Jr. et al. (1996) também utilizou em seu estudo o uso de dureza Vickers, mas verificaram a diminuição da microdureza do esmalte. Segundo o autor estas alterações devem-se a diferentes forças de aplicação, pois a seleção do tipo de dureza é determinada pelas características do material a ser analisado (PHILLIPS, 1993).

As medidas de microdureza neste estudo 1 nos mostraram que o tratamento clareador com peróxido de carbamida 37 % e 35 % ativados com laser de Argônio e lâmpada halogênea, demonstraram não haver diferença estatística significativa na superfície do esmalte entre os grupos tratados. Esses resultados corroboram com o trabalho de Murchinson *et al.* (1992) e Shannon *et al.* (1993), onde também não houve alteração da microdureza do esmalte submetido a ação do peróxido de carbamida 10 % embora outros estudos como os de Mccracken, Haywood (1995) tenham encontrado diferença no esmalte em diferentes profundidades à partir da junção amelo-dentinária. Porém, relataram que essa diferença parece não ter relevância clínica, uma vez que a saliva poderia repor as possíveis perdas minerais ocorridas com tratamento clareador. Esse trabalho é contrário ao de Pinheiro JR. et al. (1996) que observaram diminuição da microdureza do esmalte mesmo colocando os dentes em saliva artificial após tratamento com peróxido de carbamida em diferentes concentrações por 8 horas diárias, durante uma semana.

A Espectroscopia Raman foi utilizada para estudar as alterações semiquantitativas e qualitativas nos componentes do esmalte e dentina através da comparação das áreas relativas dos picos Raman antes e após o tratamento clareador.

A espectroscopia Raman fornece detalhes da composição bioquímica, da estrutura molecular e da interação das moléculas nas células e tecidos. Assim, informações bioquímicas, altamente específicas sobre proteínas, lipídeos, carboidrato, ácidos nucleicos e composição dos componentes minerais do dente (PO_4^{3-} , CO_3^{2-}) podem ser obtidos (KO et al, 2005).

No estudo 2, foi utilizada a Espectroscopia FT-Raman para avaliar as vibrações moleculares e conseqüentemente, verificar a estrutura mineral do esmalte. O sistema é composto por um laser de Nd:YAG com comprimento de onda em 1064.1nm e a potência máxima incidente sobre o espécime foi de 230mW, com uma resolução espectral de 4cm⁻¹ (PARK et al. 2004, DUSCHNER et al., 2006).

No presente estudo 2, os resultados do FT-Raman revelaram que o clareamento dental com peróxido de hidrogênio à 35%, não produziu mudanças significativas nos componentes químicos inorgânicos do esmalte. As áreas dos picos de Carbonato e fosfato não foram

significativamente alteradas após o clareamento. Em particular, observamos que o pico CO_3^{2-} ν_1 não foi alterado pelo clareamento dental, dessa forma concluímos que mesmo a alta concentração dos agentes clareadores não desmineralizou o esmalte, como também é demonstrado por Götz *et. al.* (2007)

Nosso estudo 3 com resinas compostas, mostrou a viabilidade da utilização dos LEDs através da espectroscopia FT-Raman, avaliando a composição química da resina, submetida ao manchamento com café, variando-se a fonte de luz fotoativadora e também a aplicação de agentes de proteção. Foram obtidos espectros FT-Raman que permitem adquirir informações em nível molecular das ligações químicas da resina.

Através de uma análise direta, das ligações químicas das moléculas de C-H da resina por espectroscopia FT-Raman, foi avaliada uma possível alteração na composição da resina provocada pelo manchamento por café. Assim, após o processamento dos espectros, foi calculada a área relativa da banda referente à ligação C-H com deslocamento Raman em 2933cm^{-1} (XU *et al.*, 1997).

Para o grupo controle fotoativado pela luz halógena, não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre as amostras iniciais e finais (HCi e HCf). Entretanto, para as amostras fotoativadas pelo LED esta diferença foi muito significativa. Este fato pode demonstrar uma melhor polimerização da matriz da resina pela luz halógena e menor degradação desta.

Com a análise estatística dos dados das áreas relativas das amostras após o manchamento entre os grupos que receberam a aplicação dos selantes, houve uma alteração significativa estatisticamente para as amostras fotoativadas pelo LED e protegidas pelo selante Fortify[®], onde verificamos um aumento na área relativa das amostras após o manchamento (LF vs. HF), evidenciando então uma possível degradação da matriz orgânica da resina. Essa diferença na área relativa para as amostras fotoativadas pelo LED pode ter sido causada pela diferença na densidade de potência proporcionada pela fonte de ativação, pelo modo progressivo de fotoativação, e pelo tempo de 10 segundos de fotoativação influenciando diretamente no grau de conversão produzido na resina (MAIXNER; SUSIN, 2001). Para o selante PermaSeal[®], esta comparação não foi significativa.

Em uma comparação variando-se as fontes de fotoativação, entre as marcas comerciais de selantes, não verificamos diferenças estatísticas significantes. Dessa forma, nesse estudo 3, não existem vantagens em recomendando a utilização dos selantes de superfície para evitar o manchamento das resinas compostas, porque a estética fica comprometida. A sua aplicação

deve ser cuidadosamente analisada quando indicado para melhorar a resistência e o desgaste dos compósitos e para selar margens de restaurações, conforme mencionado pelo fabricante.

Nos estudos 1 e 2 mostraram que os agentes clareadores foram capazes de promover efetivamente no clareamento dental sem promover alterações significativas na estrutura dental e as técnicas de análises foram eficazes no que diz respeito à avaliação de cor e alterações morfológicas da superfície do esmalte dental.

No estudo 3 os resultados obtidos através da análise de fotorreflectância complementam os dados fornecidos pelos espectros FT-Raman. Através dos espectros de fotorreflectância verificou-se que as amostras do grupo controle sofreram um manchamento em menor grau do que as amostras que receberam a proteção superficial através de uma resina fluida. Com os dados fornecidos pelos espectros FT-Raman, verificou-se uma menor degradação química da matriz orgânica da resina, com menor penetração do agente pigmentante nas amostras do grupo controle em comparação com os grupos protegidos pelos selantes.

A realização deste conjunto de estudos relacionados à área da Dentística foi motivada principalmente pela versatilidade proporcionada pelas técnicas empregadas nesses estudos. Além disso, buscamos evidenciar o tipo de informação que estas técnicas fornecem, pois na área da pesquisa em Odontologia, a Fotorreflectância e a espectroscopia Raman ainda são pouco conhecidas. Seguindo esta motivação, a análise de espectroscopia Raman foi utilizada para realizar estudos em compósitos e esmalte submetidos ao clareamento dental. São áreas que passaram por um grande avanço nas últimas décadas, em que novos materiais e aparelhos são desenvolvidos a cada ano. Assim, estas técnicas auxiliam neste desenvolvimento, propiciando uma objetividade em análises de cor pela Fotorreflectância e uma análise em nível molecular pelo FT-Raman, fornecendo informações importantes para o desenvolvimento da odontologia.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados e a metodologia empregada neste estudo concluímos que:

- No estudo do artigo 1 Os Peróxidos de Carbamida 35 % e 37 %, irradiados com laser, demonstraram ter o mesmo comportamento frente à análise da fotorreflectância. e os Peróxidos de Carbamida 35 % e 37 %, irradiados com lâmpada halógena, indicaram resultados diferentes na avaliação de fotorreflectância. Segundo a análise gráfica, o peróxido de carbamida 35 % (Opalescence Quick) mostrou-se ser mais efetivo que o de concentração de 37 % (Whiteness Super – FGM).
- Os resultados da dureza Vickers, no artigo 1, mostraram que o clareamento dental com 35% ou 37% peróxido de carbamida não afetaram a dureza do esmalte, independente da fotoativação (laser ou lâmpada halógena) Os dados foram analisados estatisticamente e os resultados confirmam que a dureza do esmalte foi preservado.
- No estudo 2 (artigo 2), quatro marcas de peróxido de hidrogênio 35% comercialmente disponíveis foram utilizados. A análise estatística de reflectância mostrou que houve diferenças significativas após o tratamento em todos os grupos, e os agentes clareadores Whiteform - Perox Red Formulário gel foi mais eficaz do que os outros produtos. Isto é provavelmente devido ao pH desse gel.
- Quando, no estudo 2, foram avaliadas pela espectroscopia FT-Raman, observou-se mudanças utilizando o pico centrado em 1665 cm^{-1} , que está relacionada ao pico de colágeno tipo I, mas observando os picos de fosfato e carbonato não houve alterações químicas significantes no esmalte, verificando um clareamento efetivo sem desmineralização do esmalte dental.
- No estudo 3 (artigo 3), o manchamento da resina composta foi maior para as amostras que receberam a aplicação dos selantes e a fonte de luz ativadora

influenciou no manchamento da resina composta em todos os grupos, onde os grupos ativados pelo LED apresentaram um maior manchamento.

- Para esse estudo 3, a análise por espectroscopia FT-Raman mostrou-se ser efetiva na análise da matriz da resina e a análise por fotorreflectância mostrou-se ser efetiva na análise da coloração da resina composta frente ao manchamento por café.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M. F. de; RASTELLI, A. N. de; SAAD, J. R. C. Avaliação da capacidade de polimerização de um novo dispositivo à base de LED à bateria. **J. Am. Dent. Assoc.**, São Paulo, v.4, p. 372-376, nov/dez, 2001.
- ARTZ, A H. Updating tetracycline-stained teeth bleaching technique. **Quintessence Int. Dent. Dig.**, Berlin, v.12, n.1, p.15-18, 1981.
- ASFORA, K. K., et al. Clareamento em dentes vitais: situação atual. **Rev. Odontol. Univ. St. Amaro.**, São Paulo, v.3, n.2, p.90-94, 1998.
- ATTIN, T., et al. Effect of fluoride treatment on remineralization of bleached enamel. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v.24, p.282-286, 1997.
- ATTIN, T., et al. Influence of Tea on Intrinsic Colour of Previously Bleached Enamel. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v.30, n.5, p.488-494, 2003.
- BARATIERI, L.N., et al. Agentes clareadores. In: _____. **Clareamento dental**. São Paulo: Santos, 1994. cap.3., p.12-22.
- BARATIERI, L. N.; RITTER, A. V.; MONTEIRO JR, S. M; Clareamento Dental ao alcance de todos. In TODESCAN, F. F.; BOTINO, M. A. A. **Atualização na clínica odontológica: a prática na clínica geral.**. São Paulo: APCD; Artes Médicas, 1996. p.131-159.
- BARATIERI, L. N., *et al.* **Odontologia Restauradora**: Fundamentos e Possibilidades 1ª ed. São Paulo: Quintessence, 2001.
- BAUMGARTNER, J. C.; REID, D. E.; PICKETT, A. B. Human Pulpal Reaction to the Modified McInnes Bleaching Technique. **J. Endod.**, Baltimore, v.9, n.12, p.527-529, 1983.
- BLANKENAU, R.; GOLDSTEIN, R. E.; HAYWOOD, V. B. The Current Status of Vital Tooth Whitening Techniques. **Compend. Contin. Educ. Eent.**, Jamesburg, PA., v. 20, n.8, p:781-788 1999.
- BOSCH, J. J.; COOPS, J. C. Tooth color and reflectance as related to light scattering and enamel hardness. **J. Dent. Res.**, **Washington**, v.74, n.1, p.374-80, Jan. 1995.

CARVALHO, E. M. O. F.; ROBAZZA, C. R. C.; MARQUES, J. L. L. Análise Espectrofotométrica e Visual do Clareamento Dental Interno Utilizando Laser e Calor como Fonte Catalisadora. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v.4, n.16, p.337-342, 2002.

CESAR, I. C. R., et al.. Analyses by photoreflectance spectroscopy and Vickers hardness of conventional and laser-assisted tooth bleaching. **Am. J. Dent.**, San Antonio, v. 18, n.4, p. 219-222, Aug. 2005

CHRISTENSEN, G. J. Bleaching teeth: practioner trends. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 128, p.16s-18s,1997.

CHRISTENSEN, G. J. Bleaching vital tetracycline stained teeth. **Quintessence Int.**, Berlin, v.9, p.13-19, 1978.

CIMILLI, H.; PAMEIJER, C.H. Effect of carbamide peroxide bleaching agents on the physical properties and chemical composition of enamel. **Am. J. Dent.**, San Antonio, v.14, n.2, p.63-66, 2001.

CONCEIÇÃO, E. N. **Dentística**: Saúde e Estética. Porto Alegre: Artmed, 2000.

CREWS, K. M.; HUGGINS, J. M.; ALLEN, J. Whitening obtained using 10% carbamide peroxide with varied exposure times. **J. Dent. Res.**, Washington , v.71, p.282, 1992.

DOMINGUES, L. A., et al. Selantes superficiais influenciam no manchamento das resinas? **Rev. Ass. Paul. Cir. Dent.**, São Paulo, v. 55, n.5, p. 321-325, 2001.

DUSCHNER, H., et al. Effects of hydrogen peroxide bleaching strips on tooth surface color, surface microhardness, surface and subsurface ultrastructure, and microchemical (Raman spectroscopic) composition. **J Clin Dent.**, v.17, n.3, p.72-78, 2006.

FARIA, D. L. A.; SANTOS, L. G. C.; GONÇALVES, N. S. Uma demonstração sobre o espalhamento inelástico de luz: Repetindo o experimento de Raman. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 319-323, 1997.

FRIED, D., et al Permanent and Transient changes in the reflectance of CO2 laser-irradiated Dental Hard Tissues at $\lambda = 9.3, 9.6, 10.3$ e $10.6 \mu\text{m}$ and at fluences of 1-20J/cm². **Lasers Surg. Med.**, New York, v.20, p. 22-31, 1997.

FUSHIDA, C. E.; CURY, J. A. Estudo *in situ* do efeito da frequência de ingestão de *Coca-Cola* na erosão do esmalte-dentina e reversão pela saliva. **Rev. Fac. Odontol. Univ. Sao Paulo.**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 127-134, abr./jun. 1999.

GARBER, A D. Dentist-Monitored Bleaching: A Discussion of Combination and Laser Bleaching. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.128, April, p.26-30, 1997.

GOLDSTEIN, R. E. In-office bleaching: Where we came from, where we are today. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.128, p.11-15, 1997.

GOODKING, R. J.; SCHWABACHER, W. B. Use of fiber-optic colorimeter for in vivo color measurements of 2830 anterior teeth. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v.58, n.5, p.535-541, Nov. 1987.

GÖTZ, H., et al. Effects of elevated hydrogen peroxide strip bleaching on surface and subsurface enamel including subsurface histomorphology, micro-chemical composition and fluorescence changes. **J. Dent.**, Guildford, v. 35, p.457-466, 2007.

HAYWOOD, V. B.; HEYMAN, H. O. Nightguard vital bleaching. **Quintessence Int.**, Berlin, v.20, p.173-176, 1989.

HAYWOOD, V. B.; HOUCK, V. M.; HEYMANN, H. O. Nightguard vital bleaching: how safe is it? **Quintessence Int.**, Berlin, v.22, p.515-523, 1991.

HAYWOOD, V. B. History, Safety and effectiveness of current bleaching techniques and applications of the nightguard vital bleaching technique. **Quintessence Int.**, Berlin, v.23, n.7, p.471-485, 1992.

HAYWOOD, V. B, LEONARD, R. H. Nightguard vital bleaching removes brown discoloration for 7 years: a case report. **Quintessence Int.**, Berlin, v.29, n.7, p.450-451, 1998.

HAYWOOD, V. B., et al. Tray delivery of potassium nitrate-fluoride to reduce bleaching sensitivity. **Quintessence Int.**, Berlin, v.32, n.2, p.105-109, 2001.

HEYMANN, H. O. The artistry of conservative esthetic dentistry. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, n. especial, p.15_E-23_E, 1987.

HO, S.; GOERIG, A. C. An *in vitro* comparison of different bleaching agents in the discolored tooth. **J. Endod.**, Baltimore, v.15, n.3, p. 107-111, 1989.

HOSOYA, N., et al. Changes in enamel surface roughness and adhesion of Streptococcus mutans to enamel after vital bleaching. **J. Dent.**, Guildford, v.31, n.8, p.543-548, Nov. 2003.

JOINER, A. The bleaching of teeth: A review of the literature. **J. Dent.**, Guildford, v. 34, n.7, p.412-419, 2006.

JONES, A. H., et al. Colorimetric assessment of laser and home bleaching techniques. **J. Esthet. Dent.**, Hamilton, v.11, n.2, p.87-94, 1999.

KAWAMOTO, K.; TSUJIMOTO, Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. **J. Endod.**, Baltimore, v.30, n.1, p.45-50, 2004.

KO, A.C., et al. Ex vivo detection and characterization of early dental caries by optical coherence tomography and Raman spectroscopy. **J. Biomed. Opt.**, Bellingham, v.10, n.3, p. 031118, 2005. DOI:10.1117/1.1915488

KURACHI, C., et al. Human Teeth Exposed to Argon Laser Irradiation: Determination of Power-Time-Temperature Working Conditions. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, New York, NY, v.17, n.6, p. 255-259, 1999.

KWON, Y. H., et al. Effects of hydrogen peroxide on the light reflectance and morphology of bovine enamel. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v.29, n.5, p.473-7, May, 2002.

LEWINSTEIN, I., et al. Effect of hydrogen peroxide and sodium perborate on the microhardness of human enamel and dentin. **J Endod.**, Baltimore, v.20, n.2, p. 61-63, 1994.

LI, Y. Biological properties of peroxide-containing tooth whiteners. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.34, p.887-904, 1996.

MACHADO, C. T., et al. Avaliação da microdureza de uma resina composta híbrida submetida a três tipos de aparelhos fotopolimerizadores. **JBC J. Bras. Clin. Odontol. Integr.**, Curitiba, v.6, n. 32, p.165-169, mar/abr. 2002.

MAIXNER, A. O.; SUSIN, A. H. Avaliação da alteração de cor de resina composta submetida a ação de corantes de generos alimentícios. **Revista Dentística on line**, Santa Maria, v. 1, n.2, jan./mar. 2001. Disponível em: <<http://www.ufsm.br/dentisticaonline/artigo-cor-resina.html>>. Acesso em 03 dez. 2002 .

MCCASLIN, A. J., et al. Assessing dentin color changes from nightguard vital bleaching. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.130, p. 1485-1490, Oct. 1999.

MCCRACKEN, M.; HAYWOOD, V. B. Effects of 10% carbamide peroxide on subsurface hardness on enamel. **Quintessence Int.**, Berlin, v..26, p.21-24, 1995.

MCEVOY, S. A. Chemical agents for removing intrinsic stains from vital teeth. II-Current technique and their clinical applications. **Quintessence Int.**, Berlin, v.20, p.379-384, 1989.

MELNIK, I. S.; RAWICZ, A.H.; DETZ, S. M. Color measurement of teeth and dental materials using a fiberoptic probe. In: FEATHERSTONE, J.; RECHMANN, P.; FRIED, D. (eds.). **Proceedings of lasers in dentistry IV**. Bellingham, Wash: SPIE, 1998. v.3248, p.206-213.

MENEZES, M. M.; FIROOZMAND, L. M.; HUHTALA, M. F. R. Avaliação do desgaste superficial do esmalte escovado com dentifrícios e submetido à ação de agentes branqueadores. **Ciênc. Odontol. Bras.**, São José dos Campos, v.6, n.1, p.44-50, jan./mar. 2003.

MEREDITH, N., et al. Measurement of the microhardness and young's modulus of human enamel and dentine using an indentation technique. **Arch. Oral. Biol.**, Oxford, v.4, n.6, p.539-545, 1996.

MIRANDA, M. M.; REIS, N. A.; MIRANDA, J. R. Clareamento dental endógeno e exógeno. In: CARDOSO, R. J. A.; GONÇALVES, E. A. N. **Estética**. São Paulo: Artes Médicas, 2002. cap. 17. p. 343-361.

MIYASHITA, E. **Odontologia estética: o estado da arte**. São Paulo: Artes Médicas, 2004.

MORKHLIS, C. R., et al. A clinical evaluation of carbamida peroxide and hydrogen peroxide whitening agents during daytime use. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.131, n. 9, p.1269-1277, 2000.

MONDELLI, J. Introdução à estética. In: _____. **Estética e cosmética em clínica integrada restauradora**. São Paulo: Santos. 2003. cap. 1.

MORATO, L. H.; DUARTE, R. V.; ALBUQUERQUE, R. C. Peróxido de carbamida: alternativa para o clareamento. **Rev. CROMG**, Belo Horizonte, v.4, n.1, p.65-71, 1998.

MURCHINSON, D. F; CHARLTON, D. G.; MOORE, B. K. Carbamide peroxide bleaching: effects on enamel surface hardness and bonding. **Oper. Dent.**, Seattle, v.17, n.5, p.181-185, 1992.

NEWBRUN, E.; PIGMAN, W. The hardness of enamel and dentin. **Aust. Dent. J.**, Sydney, v. 4, p.210-217, 1960.

PARK, H.J., et al. Changes in bovine enamel after treatment with a 30% hydrogen peroxide bleaching agent. **Dent. Mater. J.**; Tokyo, v.23, n.4, p.517-521. 2004.

PESUM, I. J.; MADDEN, R. A review of the current status of vital bleaching. **Northwest Dent.**, St Paul, MN., v. 78, n.2, p.25-33, 1999.

PHILLIPS, R. W. **Skinner materiais dentários**. 9^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993.

PÍCOLO, K. R.; BEZ, T. D.; DIEGOLI, N. M. Avaliação *in vitro* dos tratamentos de superfície nos reparos em restaurações de resina composta. **Alcance**, Itajaí. v.9, n.2, p.59-65, set. 2002.

PIMENTA, I. C.; PIMENTA, L. A. F. Clareamento Dental Caseiro – Riscos e Benefícios: O que o clínico precisa saber. **Rev. Bras. Odontol.**, Rio de Janeiro, v.55, n.4, p.195-200, 1998.

PINHEIRO JÚNIOR, E.C., et al. *In vitro* action of various carbamide Peroxide gel bleaching agents on microhardness of human enamel. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v.7, n.2, p.75-79, 1996.

POWELL, G.L., et al. Laser and curing light induced *in vitro* pulpal temperature changes. **Lasers Surg. Med.**, New York, v.17, n.1, p.3-5, 1999.

RAMOS, R. A. S.; VILLA, G. E. P. Influência do peróxido de carbamida 10 por cento na cor de resinas compostas. **Rev. odontol. UNICID**, São Paulo, v. 11, n. 2, p.105-109, jul./dez. 1999.

RATANAPRIDAKUL, K.; LEINFELDER, K. F.; THOMAS, J. Effect of finishing on the *in vivo* wear rate of a posterior composite resin **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.118, n.5, p.524. 1989

REYTO, R. Laser tooth whitening. **Dent. Clin. North Am.**, Philadelphia, v.42, n.4, p.755-762, 1998.

RODRIGUES, J. A., et al. Effects of 10 percent carbamide peroxide on enamel microhardness at different bleaching times. **Am. J. Dent.**, San Antonio, v.14, n.2, p.67-71, 2001.

RODRIGUES, J. A.; OLIVEIRA, G. P. F.; AMARAL, C. M. Avaliação *in vitro* da efetividade de diferentes Sistemas clareadores caseiros. **Arq. Odontol.**, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.29-26, jan./mar. 2005.

ROSENSTIEL, S. F.; GEGAUFF, A G.; JHONSTON, W. M. Duration of Tooth Color Change After Bleaching. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.123, p.54-59, 1991.

ROTSTEIN, I., et al. Histochemical Analysis of Dental Hard Tissues following Bleaching. **J. Endod.**, Baltimore, v.22, n.1, p.23-26, 1996.

SHANNON, H., et al. Characterization of exposed to 10% carbamide peroxide bleaching agents. **Quintessence Int**, Chicago, v.24, p.39-44, 1993.

SHIN, W. S., et al. Determination of degree of cure of dental resins using Raman and FT-Raman spectroscopy. **Dent. Mater.**, Washington, v. 9, p. 317-324, Sept., 1993.

SMIGEL, I. Laser Tooth Whitening. **Dent. Today.**, Montclair NJ, v.15, n.8, p.32-36, 1996.

SOARES, A. L. S. **Fotorrefletância, microdureza e microscopia eletrônica de varredura do esmalte dental humano, submetido ao clareamento *in vitro* com ativação por laser de argônio ou matriz de leds associada a laser de diodo.** 2004. 93f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, UNIVAP, São José dos Campos, 2004.

SOARES, L. E. S., et al. Effects of Treatment for Manipulation of Teeth and Er:YAG Laser Irradiation on Dentin: A Raman Spectroscopy Analysis. **Photomed. Laser Surg.**, Larchmont, v. 25, p. 50-57, 2007.

SPYRIDES, G. M. et al. A influência dos agentes clareadores na adesão dentinária. **JBC: J Bras de Clín e Estet Odontol**, v.3, n.18, p.25-31, 1999.

SCHULZE, K. A. et al. Color stability and hardness in dental composites after accelerated aging. **Dental Materials**, v. 19, p. 612-619, 2003.

TAMES, D.; GRANDO, L.J.; TAMES, D.R. Alterações do esmalte dental submetidos ao tratamento com peróxido de carbamida 10% **Revista da APCD**, v.52, n.2, p.145-149, 1998.

TORRES, A. C. M.; ARAÚJO, M. A. M. Selamento de superfície em restaurações de resina composta: Avaliação clínica e de modelos de estudo. **Pós-Grad. Rev. Fac. Odontol.** São José dos Campos, v. 3, n. 2, p. 108-120, jul./dez 2000.

XU, J., et al. An FT-Raman spectroscopic investigation of dentin and collagen surfaces modified by 2-Hydroxyethylmethacrylate. **J. Dent. Res.**, Washington, v.76, n.1, p.596-601, 1997.

WILLIAMS, H. A.; RUEGGERBERG, F. A.; MEISTER, L. W. Bleaching the natural dentition to match the color of existing restorations: case reports **Quintessence Int.**, Chicago, v.23, n.10, p. 673-677, 1992.

WHITE, D. J., et al. Peroxide interactions with hard tissues: effects on surface hardness and surface/subsurface ultrastructural properties. **Compend. Contin. Educ. Dent.**, Jamesburg, PA, v.23, n.1A, p.42-48; 2002.

WHITE, D. J., et al. Effects of Crest Whitestrips bleaching on surface morphology and fracture susceptibility of teeth in vitro. **J. Clin. Dent.**, Yardley, PA, v.14, n.4, p.82-87, 2003.

YIMING, L. I. Tooth Color Measurement Using Chroma Meter: Techniques, Advantages, and Disadvantages. **J. Esthet. Restor. Dent.**, Hamilton, v.15, n.1, p.33-41, 2003.

ZANIN, F.; BRUGNERA JUNIOR, A. **Clareamento Dental com Luz - Laser**. Porto Alegre: RGO Editora Informação e Didática, 2002.

ZANIN, F.; BRUGNERA JUNIOR, A. **Clareamento Dental com Luz – Laser**. 2. ed. São Paulo: Editora Santos, 2004.

ANEXO A - Declaração de doação de dentes bovinos

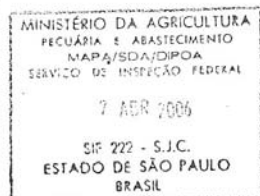
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que os dentes bovinos obtidos neste Frigorífico Campos de São José Ltda, - CNPJ-05644477/0001-23, inscrito no Serviço de Inspeção Federal sob nº 222, supervisão do Fiscal Federal Agropecuário Alemar Lourenço da Costa, foram doados e serão utilizados para finalidade de pesquisa; que será realizado na Universidade Vale do Paraíba, sob responsabilidade da Professora Dra Priscila Christiane Suzy Liporoni

SJ&CAMPOS, 07 de Abril de 2.006

Alemar Lourenço da Costa
Médico Veterinário
CRM-V-SP 2149
Serviço Federal Agropecuário



ANEXO B - Amostras Imersas em Saliva

Todas as amostras foram mantidas imersas na solução de saliva artificial, em um Porta-amostra de acrílico, dentro de uma estufa a 37°C, durante todo o experimento. Para cada amostra foram utilizados 2 ml de saliva artificial (pH 7,0), volume medido com uma seringa plástica de 5 ml¹, sendo que a saliva artificial era trocada diariamente.

A saliva utilizada neste estudo foi produzida artificialmente por uma farmácia de manipulação² sendo a sua composição química descrita na figura 9.

Componentes	Quantidade para 1000 ml
Cloreto de Cálcio	0,166 g
Benzoato de Sódio	1,0 g
CMC	10,0 g
Cloreto de Magnésio	0,05 g
Cloreto de Sódio	0,825 g
Cloreto de Potássio	0,620 g
Fluoreto de Sódio	4,29 g
Sorbitol	42,74 g
Água Destilada	940,82 ml
Fosfato	0,8035 g
Fosfato de Potássio Monobásico	0,326 g

Composição química da saliva artificial

¹ BD Pastiplak®

² Byofórmula®

ANEXO C - Consentimento Livre e Esclarecido em Pesquisa Científica

Eu, _____, RG n° _____, residente à _____, n° _____, bairro _____, na cidade de _____, consinto em participar da pesquisa científica a ser realizada por _____ RG _____, residente à Rua _____, na cidade de _____, ciente e de acordo com os itens abaixo:

1. À justificativa, os objetivos, e aos procedimentos a serem realizados na pesquisa;
2. À garantia ao sigilo que assegura minha privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa;
3. O não comprometimento do pesquisador com a realização de quaisquer outros tipos de tratamentos;
4. À inexistência de qualquer espécie de benefício, a não ser informativo, tanto por parte da Universidade quanto dos pesquisadores.
5. No caso de extração de dente, por extrema necessidade ortodôntica, periodôntica e/ou cirúrgica, permito o uso do mesmo para estudos científicos e análises laboratoriais.

São José dos Campos _____ de _____ de _____

Assinatura do Voluntário

Assinatura do Pesquisador

ANEXO D – Comitê de Ética em Pesquisa.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos, que o Protocolo n.º 038/2001/CEP, sobre “*Estudo da fotoreflexância e da microdureza do esmalte hígido submetidos à técnica de clareamento dental tradicional e com laser de argônio*”, sob a responsabilidade de Marcela Leal Redígolo, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos, conforme Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 14 de agosto de 2001



PROF. LUIZ CARLOS ANDRADE DE AQUINO
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da Univap

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º A006/2006/CEP, intitulado “*Estudo in vitro do clareamento dental em blocos dentais bovinos através da análise de fotorrefletância e espectroscopia FT-Raman*”, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Priscila Christiane S. Liporoni, está de acordo com a Lei 11977/2005 (SP), os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA/1991), e as Normas Para a Prática Didático-Científica da Vivisseccção de Animais (Lei 6638/1979) sendo, portanto, **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 02 de maio de 2006.



PROF. DR. LANDULFO SILVEIRA JUNIOR
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVAP

ANEXO E - Principais equipamentos utilizados.

Tipo	Marca Comercial	Modelo
Laser de Argônio	Spectra Physics	Stabilite 2017
Aparelho LED	GGDENT	LD13
Aparelho LED/Laser	Brightness – Kondortech	
Aparelho fotopolimerizador	DEGULUX	SOFT-START
Medidor de Potência	Melles Griot	13 PEM 001
FT-Raman	BRUKER	RFS-100
Espectrômetro	ORIEL INSTRUMENTS	77702
Câmera CCD	ORIEL INSTRUMENTS	DH5 20
Gerador de Atraso	Stanford Research Systems	DG 535
Esfera Integradora	Oficina Mecânica da Univap	
Lâmpada Halógena	ROI (Ram Optical Instrumentation)	150 Illuminator
Estufa	FANEM	ORION 502
Cafeteira	SIELD	AROMACAFÉ 12
Digital Microhardness Tester	Future Tech	FM
Politriz Elétrica	Struers	Knuth Rotor
Politriz Elétrica	Struers	DP
Politriz Elétrica	Struers	DP-10